



Universidade Federal de São Paulo  
Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Análise Ambiental Integrada



**ROBERTA ANTONIOLI**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ACIDIFICAÇÃO E  
RESSUSPENSÃO SOBRE A TOXICIDADE DO TBT EM  
SEDIMENTOS MARINHOS.**

DIADEMA  
2019

**Roberta Antonioli**

**Avaliação dos efeitos da acidificação e ressuspensão sobre a toxicidade do  
TBT em sedimentos marinhos.**

Dissertação apresentada, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências, ao Programa de Pós-Graduação em Análise da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Brasil Choueri  
Co-Orientador: Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa

DIADEMA  
2019

Antonioli, Roberta

Avaliação dos efeitos da acidificação e ressuspensão sobre a toxicidade do TBT em sedimentos marinhos / Roberta Antonioli. -- Diadema, 2019.

56 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós-Graduação em Análise Ambiental Integrada) - Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2019.

Orientador: Rodrigo Brasil Choueri

Co-Orientador: Denis Moledo de Souza Abessa

1. TBT. 2. Acidificação. 3. Sedimento Integral. 4. Toxicidade. 5. Elutriado I. Título.

CDD 571.95

*Aos que mais amo: Edgard,  
Wilma, Leonardo, Amora,  
Akira, Yasmin e Anna Beatriz*

## Agradecimentos

Primeiramente, agradeço à vida, por todos que de alguma forma caminharam comigo nesta jornada e contribuíram para que eu me tornasse a mulher que sou.

Agradeço aos meus pais, por todo apoio, amor, educação e força. Por se fazerem presentes mesmo há centenas de quilômetros de distância e por todo esforço que fazem por mim e pelos meus.

Ao meu companheiro, Leonardo, por possibilitar direta e efetivamente a realização deste trabalho, desde a responsabilidade pelo sustento de nossa família à ajuda no laboratório. Você foi imprescindível e sou eternamente grata por tudo que nos proporciona. Te amo incondicionalmente.

Aos meus filhos, Amora e Akira, e sobrinhas, Yaya e Bia, por me ensinarem o que realmente importa nessa vida. Vocês são minha inspiração e minha força.

Agradeço ao meu orientador, Professor Rodrigo Brasil Choueri, por todo ensinamento, paciência e compreensão.

Ao meu co-orientador, Professor Denis Moledo de Souza Abessa por ser meu eterno professor, a quem eu sempre posso recorrer para conversar tudo, de ciência à maternidade. Você é minha eterna referência de ser humano, profissional, pai, professor, biólogo, cientista. Obrigada!

Aos Professores Ítalo de Castro Braga, Lucas Buruaem Moreira e Fernando Cesar Perina, pela atenção ao desenvolvimento deste projeto e ajuda com a realização dos ensaios e análises.

À Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pelo apoio financeiro.

*“most importantly love  
like it's the only thing you know how  
at the end of the day all this  
means nothing  
this page  
here you're sitting  
your degree  
your job  
the money  
nothing even matters  
except the love and human connection  
who you loved  
and how deeply you loved them  
how you touched the people around you  
and how much you gave them”*

Rupi Kaur

## Resumo

O TBT foi o anti-incrustante mais usado no mundo entre as décadas de 1960 e 2000 e dada sua elevada toxicidade, sua utilização foi banida em 2003. No entanto, como sua persistência no ambiente sedimentar é alta e seu uso ainda é observado em países em desenvolvimento, diversas áreas portuárias e de marinas em todo o mundo estão muito contaminadas, apesar das regulamentações criadas. Além da toxicidade inerente ao TBT, alterações físico-químicas do meio marinho, como acidificação, e eventos que ressuspendem os sedimentos, como dragagens, podem alterar a toxicidade e biodisponibilidade do TBT presente no ambiente sedimentar. Assim, o presente estudo avaliou os efeitos da acidificação do sedimento sobre a toxicidade do TBT, bem como a influência de eventos de perturbação associados a um ambiente marinho acidificado e contaminado. A toxicidade do sedimento integral contaminado foi avaliada através de ensaio de fecundidade com *Nitokra* sp. Os eventos de perturbação foram simulados através da elutriação dos sedimentos e a toxicidade do elutriado foi avaliada através de ensaios de desenvolvimento embrio-larval com embriões de ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*. O possível fluxo do contaminante do sedimento para coluna d'água na ausência de perturbação foi avaliado com o mesmo ensaio proposto para o elutriado. Os resultados indicaram que o pH influencia a toxicidade do TBT em sedimento integral para *Nitokra* sp, mas a faixa de concentrações testadas não permitiu identificar efeito deste fator na toxicidade do elutriado e da ISA sobre o desenvolvimento embriolarval de *E. lucunter*. Nos dois últimos o nível de contaminação do sedimento foi preponderante na disponibilização do TBT para a coluna d'água, uma vez que nas maiores concentrações em sedimento, o elutriado e a interface foram altamente tóxicos. A  $CE_{50-96h}$  obtida para *Nitokra* sp foi 372,5 µg/kg (IC 95%: 192,9 – 719,5 µg/Kg), no entanto, em ambiente acidificado o valor determinado para  $CE_{50-96h}$  foi 4,2 µg/kg (IC 95%: 1,89 - 9,19 µg/Kg). Para os elutriados e interfaces os valores de  $CE_{50-42h}$  não diferiram significativamente entre eles, nem nos diferentes pHs testados. Os valores de  $CE_{50}$  obtidos no presente estudo indicam a necessidade do aprofundamento dos trabalhos que norteiam os valores guia de qualidade dos sedimentos contaminados com TBT, considerando que o ambiente está sujeito à eventos de ressuspensão e alterações físico-químicas.

**Palavras-chave:** TBT, Acidificação, Sedimento Integral, Elutriado, Toxicidade

## Abstract

TBT was the most widely used antifouling in the world between the 1960s and 2000s and due to its high toxicity, it was banned in 2003. However, as TBT persists in the sedimentary environment and its use is still observed in underdeveloped countries, several port and maritime areas around the world are still today heavily contaminated despite the regulations created. In addition to the inherent toxicity of TBT, physicochemical changes in the marine environment - such as acidification, and sediment resuspension (e.g. during dredging operations) - may alter the toxicity and bioavailability of TBT. Thus, the current study evaluated the effects of sediment acidification on TBT toxicity, as well as the influence of disturbance events associated with an acidified and contaminated marine environment. Toxicity of TBT-spiked whole sediment was evaluated by means of fecundity assay with *Nitokra* sp. Disturbance events were simulated by sediment elutriation and elutriate toxicity was assessed by embryo-larval development assays with *Echinometra lucunter* sea urchin embryos. The possible flow of the contaminant from sediment to water column in the absence of disturbance was evaluated by sediment-water interface (SWI) exposure with the same test used for the elutriate test. The results indicated that pH influences the toxicity of TBT in whole sediment to *Nitokra* sp. However, the concentration range tested was not suitable to identify the effect of pH or resuspension on the toxicity of TBT, since no intermediate toxicity was found within the tested concentrations. The  $EC_{50-96h}$  obtained for *Nitokra* sp was  $372.5\mu\text{g/kg}$  (95% IC:  $192.9 - 719.5\mu\text{g/kg}$ ), however, in an acidified environment the value determined for  $EC_{50-96h}$  was  $4.2\mu\text{g/kg}$  (95% IC:  $1.89 - 9.19\mu\text{g/kg}$ ). For the elutriates and interfaces the values of  $EC_{50-42h}$  did not differ significantly between them, nor in the different pHs tested. The  $EC_{50}$  values obtained in the present study indicate the need for further studies of quality guide values of sediments contaminated with TBT, considering that the environment is subject to resuspension events and physicochemical alterations. Values indicate the need for further studies that guide the quality guide values of TBT-contaminated sediments, especially when they are subject to resuspension events and physicochemical changes.

**Keywords:** TBT, Acidification, Whole Sediment, Elutriate, Toxicity



## Lista de Figuras

- Figura 1. Representação esquemática do sistema de injeção de CO<sub>2</sub> em caixa hermética. (1) cilindro de CO<sub>2</sub>; (2) cano de distribuição do gás; (3) regulador; (4) béquer com água onde o CO<sub>2</sub> é injetado; (5) distribuição de CO<sub>2</sub> por difusão; (6) troca gasosa; (7): sensor de pH ligado a interface (8) que o conecta ao sistema de controle (9); 10: Laptop com software Aqua Medic. \_\_\_\_\_ 21*
- Figura 2. Representação do sistema de ISA. A seta representa o possível fluxo de contaminantes. \_\_\_\_\_ 24*
- Figura 3. Ensaio de fecundidade de Nitokra sp com amostras de sedimento integral. As letras acima das barras de desvio padrão representam as diferenças significativas para o fator “nível de contaminação”. Os números acima das barras de erro representam as diferenças significativas para o fator “pH” dentro de cada concentração ( $p < 0,05$ ). \_\_\_\_\_ 31*
- Figura 4. Ensaio preliminar de desenvolvimento embriolarval com amostras de elutriado. Os asteriscos (\*) representam amostras com diferença significativa do controle acetona ( $p < 0,05$ ). \_\_\_\_\_ 37*
- Figura 5. Ensaio de desenvolvimento embriolarval com amostras de A: Elutriado e B: Interface sedimento água. Os asteriscos (\*) representam amostras com diferença significativa do controle acetona ( $p < 0,05$ ). 40*

## Lista de Tabelas

- Tabela 1. Especiação do sistema carbonato para os ensaios de elutriação e interface sedimento água nos diferentes cenários de acidificação. AT: Alcalinidade total, CIT: Carbono Inorgânico total,  $\text{HCO}_3^-$ : Bicarbonato,  $\text{CO}_3^{2-}$ : Carbonato;  $p\text{CO}_2$ : Pressão parcial de  $\text{CO}_2$ ;  $\Omega$   $\Omega$  Cal: Estado de saturação para calcita;  $\Omega$  Arag: Estado de saturação para aragonita. \_\_\_\_\_ 28*
- Tabela 2. Resultados do ensaio de toxicidade com sedimento integral e os parâmetros físico-químicos analisados (OD= Oxigênio Dissolvido, Sal= Salinidade, Temp= Temperatura,  $\text{NH}_3$ = Amônia Não Ionizada) \_ 29*
- Tabela 3 Resultados da análise de PERMANOVA avaliando efeito da contaminação de TBT, pH do meio e interação destes fatores sobre a fertilidade de Nitokra sp. Valores destacados em negrito indicam  $p<0.05$  \_\_\_\_\_ 30*
- Tabela 4. Resultados do ensaio preliminar de toxicidade com elutriado e os parâmetros físico-químicos analisados (OD= Oxigênio Dissolvido, Sal= Salinidade, Temp= Temperatura e  $\text{NH}_3$ = Amônia Não Ionizada) 34*
- Tabela 5. Resultados da análise de PERMANOVA avaliando efeito da contaminação de TBT, pH do meio e interação destes fatores sobre o desenvolvimento embriolarval de Echinometra lucunter no ensaio preliminar. Valores destacados em negrito indicam  $p<0.05$  \_\_\_\_\_ 35*
- Tabela 6. Resultados dos ensaios de toxicidade com elutriado e interface sedimento-água e os parâmetros físico-químicos analisados (OD= Oxigênio Dissolvido, Sal= Salinidade, Temp= Temperatura,  $\text{NH}_3$ = Amônia Não Ionizada e salinidade). Amostras contendo \* foram consideradas outliers. \_\_\_\_\_ 38*
- Tabela 7. Resultados da análise de PERMANOVA avaliando efeito da contaminação de TBT, pH do meio, ressuspensão do sedimento e interação destes fatores sobre o desenvolvimento embriolarval de Echinometra lucunter. Valores destacados em negrito indicam  $p<0.05$  \_\_\_\_\_ 39*
- Tabela 8. Resultados das concentrações de efeito ( $\text{CE}_{50}$ ) obtidas nos ensaios com Nitokra sp e Embriões de Echinometra lucunter. \_\_\_\_\_ 42*

## Sumário

1.	Introdução .....	11
1.1.	Objetivos.....	16
2.	Material e Métodos .....	17
2.1.	Desenho Experimental.....	17
2.2.	Coleta e Caracterização dos Sedimentos .....	18
2.3.	Contaminação do Sedimento (Spiking).....	20
2.4.	Acidificação.....	21
2.5.	Sedimento Integral ( <i>Nitokra</i> Sp.).....	22
2.6.	Elutriação.....	23
2.7.	Interface Sedimento-Água .....	23
2.8.	Ensaio de Desenvolvimento Embrio-Larval ( <i>Echinometra Lucunter</i> ).....	24
2.9.	Análise dos Dados .....	26
3.	Resultados e Discussão.....	26
3.1.	Caracterização do Sedimento .....	26
3.2.	Especiação Sistema Carbonato .....	27
3.3.	Ensaio de Toxicidade .....	28
3.3.1.	Ensaio de Sedimento Integral .....	28
3.3.2.	Ensaio de Elutriação e Interface Sedimento Água.....	34
3.4.	Aspectos Legais .....	40
4.	Conclusão .....	44
	Referências Bibliográficas.....	46

## 1. Introdução

A bioincrustação é o processo de adsorção, colonização e desenvolvimento de organismos aquáticos (Clare, 1996) como bactérias, algas, anêmonas, corais, esponjas, cracas e mexilhões (Calow & Calow, 2002) em substratos consolidados. Este processo pode ocorrer em substratos naturais, como costões rochosos ou rochas submersas, mas também em estruturas artificiais como píers, plataformas, oleodutos, torres de resfriamento, barcos, navios ou qualquer outra superfície que permita a adesão das larvas.

A bioincrustação gera muitos problemas econômicos e técnicos (Yebra *et al.*, 2003). Dentre eles, por exemplo, quando não protegidas por sistemas anti-incrustantes estruturas metálicas sofrem aumento da corrosão e embarcações podem ganhar até 150 kg de organismos por metro quadrado em menos de seis meses no mar (IMO, 1998). Em cascos de embarcações, a bioincrustação leva à redução de velocidade devido ao ganho de peso e o aumento do atrito com a água. Como consequência, notáveis prejuízos econômicos são gerados pelo aumento do tempo de viagem e consumo de combustível, além do tempo em que a embarcação permanece inoperante para manutenção e pintura (WHOI, 1952).

Atualmente, o transporte marítimo é o principal modal para dar vazão à produção agropecuária, industrial e extrativista, e o seu desenvolvimento envolve não apenas a evolução dos navios, mas também de toda uma estrutura, como portos, píers, plataformas, dutos entre outros equipamentos de suporte à navegação. Nos últimos 30 anos, o transporte marítimo aumentou em cerca de 130%, representando hoje 80% do comércio global (Nobre & Santos, 2005). Uma vez que a manutenção de toda a estrutura que fornece apoio ao transporte marítimo, assim como as embarcações, se dá com a utilização de sistemas anti-incrustantes, destaca-se a importância econômica do uso desta tecnologia, cuja forma predominante (mas não exclusivamente) emprega o uso de tintas contendo biocidas. Desta forma, existe a demanda atual por produtos anti-incrustantes eficientes, ou seja, eficazes em evitar a bioincrustação e

com alta durabilidade. Além disso, como estes biocidas acabam sendo introduzidos no ambiente aquáticos por diferentes vias, devem também apresentar baixo risco ambiental.

Os primeiros sistemas anti-incrustantes datam de 1500 a.C., quando fenícios e cartagineses, primeiras civilizações navegadoras, revestiam seus barcos com uma mistura de óleo de baleia e chumbo ou cobre (WHOI, 1952). Estes sistemas a base metais, como óxidos de cobre, zinco e mercúrio foram utilizados em larga escala até a década de 1960 do século XX, chamadas tintas de primeira geração, no entanto, apesar de eficientes biocidas sobre uma gama de organismos incrustantes, apresentavam durabilidade inferior a um ano e exigiam que os navios passassem por manutenção e pintura com grande frequência (Huggett *et al.*, 1992).

Na década de 1960, os óxidos metálicos foram substituídos por compostos organoestânicos (TBT – Tributilestanho e TPT – Trifenilestanho), que passaram a compor as tintas de segunda geração. As novas substâncias mostraram-se muito eficientes e versáteis, tornando-as vastamente utilizadas pelo mundo. No entanto, seu uso intensivo gerou um enorme problema ambiental, uma vez que o TBT apresenta elevada toxicidade para organismos não-alvo como poliquetos, moluscos, crustáceos, embriões de equinodermos e peixes (Meador & Rice, 2001; Perina, 2009; Costa *et al.*, 2014, Petracco *et al.*, 2015), além de potencial de bioacumulação e biomagnificação na cadeia trófica (Murai *et al.*, 2008). O TBT ainda produz em gastrópodes o efeito pelo qual ficou mais conhecido seu impacto ambiental: o *imposex*, quando se observa o desenvolvimento de caracteres masculinos (pênis) em fêmeas (Smith, 1971; Horigushi, 2006). Além de tóxico, apresenta persistência no ambiente (sua meia-vida em sedimentos varia da ordem de meses a anos) (Batley *et al.*, 1992; Champ & Seligman, 1996; Seligman *et al.*, 1996, Choi *et al.*, 2010) e portanto representa um importante passivo ambiental em áreas portuárias e marinas de todo mundo (Shim *et al.*, 2000; Barakat *et al.*, 2001; Bhosle *et al.*, 2004; Viglino *et al.*, 2006; Berto *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2009; Abidli *et al.*, 2011; Castro & Fillmann, 2012; Castro *et al.*, 2012; Borges *et al.*, 2013; Moreira

*et al.*, 2013; Paz-Villarraga *et al.*, 2015; Artifon *et al.*, 2016, Lofrano *et al.*, 2016; Lam *et al.*, 2017).

Frente ao exposto, os compostos organoestânicos tiveram sua utilização na fabricação de tintas anti-incrustantes banida em 2003, no intuito de que até 2008 não fossem mais observados resíduos em cascos de navios (IMO, 2001). No entanto, ainda é possível comprar tintas à base de TBT e TPT em alguns países, como no Brasil (Castro *et al.*, 2011). Além disso, estudos realizados após o banimento do TBT ainda evidenciam sua introdução recente em ambientes costeiros de diferentes países como Brasil (Zeidan & Boehs, 2015; Artifon *et al.*, 2016), Venezuela (Paz-Vilarraga *et al.*, 2015) e Argentina (Martínez *et al.*, 2017), através de monitoramento químicos e da detecção de imposex.

No ambiente aquático, a maior parte do TBT se associa ao material particulado e se deposita no fundo marinho, sendo geralmente encontrado nos sedimentos coletados em áreas de intensa movimentação de embarcações, como portos, estaleiros e marinas (Shim *et al.*, 2000; Barakat *et al.*, 2001; Bhosle *et al.*, 2004; Viglino *et al.*, 2006; Berto *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2009; Abidli *et al.*, 2011; Castro & Fillmann, 2012; Castro *et al.*, 2012; Artifon *et al.*, 2016). Estas áreas estão comumente sujeitas a eventos de perturbação que revolvem o fundo, como zonas de máxima turbidez em estuários, passagem de tempestades, frentes frias e operações de dragagem (Nowell *et al.*, 1999). Esses eventos ressuspendem os contaminantes encerrados no sedimento e podem disponibilizá-los na coluna d'água (Hoch, 2001), aumentando o risco de contaminação da biota pelágica.

Além dos eventos de perturbação ou associadas a eles, alterações de propriedades físico-químicas do meio aquático podem influenciar no processo de dissociação de contaminantes adsorvidos às partículas de sedimento e/ou na matéria orgânica. Parâmetros como pH, potencial redox, salinidade e temperatura do meio determinam maior ou menor biodisponibilidade de

uma mesma concentração de contaminante para os organismos expostos, alterando a toxicidade. Em especial, as alterações de pH se tornaram importantes objetos de estudo dentro da ecotoxicologia aquática, dadas as previsões de acidificação dos oceanos para os próximos anos, consequência do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera (IPCC, 2011).

O pH mais ácido geralmente está relacionado à dissociação de muitos contaminantes, sendo esta, usualmente, a forma mais tóxica (Rendal *et al.*, 2011). Especificamente sobre o TBT, sabe-se que em ambientes aquáticos sua especiação é controlada principalmente pela atividade do íon hidrogênio (pH) (Meador, 2000). Burton *et al.* (2004) observou que a salinidade e o pH influenciam nas proporções das diferentes espécies de TBT (TBT<sup>+</sup>, TBTOH e TBTCI). Em pH ≤ 6 predominam as espécies TBT<sup>+</sup> e TBTCI. Conforme o pH aumenta, ambas as espécies se transformam em TBTOH, sendo esta a forma majoritariamente presente em pH ≥ 8 (Arnold *et al.* 1997). Em condições ácidas, quando a salinidade está em torno de 30, a espécie predominante é o TBTCI, enquanto em salinidade 5, o TBT<sup>+</sup> é a espécie mais encontrada (Burton *et al.*, 2004). Como a espécie TBTCI é mais hidrofóbica, tende a se ligar ao material particulado e decantar no ambiente sedimentar, podendo tornar-se disponível aos organismos que se alimentam de matéria orgânica no sedimento. Já as espécies TBT<sup>+</sup> e TBTOH, mais solúveis em água, podem estar relacionados à exposição via dérmica dos organismos pelágicos, epipelágicos e bentônicos (através da água intersticial). No entanto a transferência de contaminantes orgânicos para a biota aquática depende de outros fatores, como a lipofilicidade, que é alterada em condições ácidas (Erickson *et al.*, 2006; Rendal *et al.*, 2011), o que ressalta a importância da avaliação dos efeitos em diversos cenários de exposição.

Para avaliar os efeitos dos contaminantes, das perturbações e da acidificação do meio sobre a biota, os ensaios ecotoxicológicos são ferramentas eficientes, que partem do princípio que os organismos interagem com o meio e podem, conseqüentemente, sofrer efeitos dos poluentes quando estes estão presentes (Chapman, 2002; Zagatto, 2006). Através destes ensaios

é possível estimar a toxicidade aguda ou crônica de uma dada amostra por meio da sobrevivência, reprodução, crescimento e/ou desenvolvimento do organismo escolhido. Os ensaios ecotoxicológicos são simples, relativamente rápidos e de baixo custo, além de serem métodos adequados e confiáveis para estimar a toxicidade (USEPA, 2002).

A avaliação da toxicidade de determinados contaminantes no sedimento integral é feita com uso de organismos bentônicos, como anfípodos, copépodos, poliquetos, isópodos, entre outros. Os copépodos harpacticoides, por sua vez, são o segundo táxon mais abundante da meiofauna e, portanto, muito representativos no ambiente sedimentar (Coull, 1990), servindo de alimento a uma grande variedade de peixes e invertebrados. Vêm sendo amplamente aplicados em ensaios de ecotoxicidade devido à sensibilidade à diversos contaminantes, hábitos de vida diretamente ligados à matriz do ensaio, facilidade de cultivo em laboratório e tolerância a uma ampla faixa de fatores abióticos como granulometria, salinidade e temperatura (Lotufo e Abessa, 2002).

Já os ensaios ecotoxicológicos de desenvolvimento embriolarval de ouriço-do-mar tem sido globalmente empregados devido à rapidez na execução, baixo custo e facilidade na obtenção dos gametas, além dos organismos apresentarem distribuição cosmopolita (Dinnel & Stober, 1985) e sensibilidade a diversos contaminantes (Allen, 1971; Cherr et al., 1987; Dinnel *et al.*, 1989; Kobayashi & Okamura, 2002; Bellas *et al.*, 2004).

O TBT, dada sua elevada toxicidade, tem sido muito estudado e regulamentado no mundo. Muitos países desenvolveram normas e diretrizes próprias acerca do seu uso e níveis ambientais (IPCS, 1990; Canadian Council of Ministers of the Environment, 1999, ANZECC & ARMCANZ, 2000; USEPA, 2004; DEFRA, 2010), no entanto, não há entendimento de como a toxicidade pode afetar ou ser afetada pelas mudanças previstas para um futuro próximo. As possibilidades de interações entre toxicidade, mudanças climáticas e acidificação dos oceanos



são muitas e a ocorrência delas vem sendo muito pouco estudadas experimentalmente (Nikinmaa, 2012). Apesar do alto  $K_{ow}$  e afinidade com o sedimento, substâncias hidrofóbicas podem também ficar mais biodisponíveis com eventos de ressuspensão dos sedimentos (Geffard *et al.*, 2002), principalmente em meio ácido (Rendal *et al.*, 2011). Sendo estes biocidas encontrados principalmente em áreas de navegação costeira e, portanto, sujeitas a atividades de dragagem regulares e processos de acidificação, este estudo apresenta grande relevância ambiental, especialmente relacionada à compreensão do comportamento tóxico de contaminantes em meio marinho fornecendo subsídios para sua melhor gestão.

### 1.1. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da acidificação do sedimento sobre a toxicidade do TBT, bem como a influência de eventos de perturbação associados a um ambiente marinho acidificado. Esses objetivos tiveram como base as hipóteses de que (i) alterações do pH modificam a disponibilidade do TBT para a biota aquática e (ii) que essa disponibilização pode ser acentuada em cenários combinados de acidificação e ressuspensão do sedimento. Sendo assim, os objetivos específicos são:

- Avaliar a toxicidade do sedimento integral fortificado com TBT em um ambiente acidificado sobre a reprodução de *Nitokra* sp. e comparar com a toxicidade desse mesmo sedimento em ambiente não acidificado;
- Avaliar a toxicidade do elutriado de sedimento fortificado com TBT e acidificado sobre o desenvolvimento embrio-larval de ouriço-do-mar (*Echinometra lucunter*) e comparar com a toxicidade do elutriado em pH natural de água do mar;
- Avaliar a toxicidade na interface sedimento-água de sedimento fortificado com TBT em cenários acidificados em comparação com cenário não acidificado, através de ensaios de interface sedimento-água avaliando desenvolvimento embrio-larval de ouriço-do-mar

(*Echinometra lucunter*).

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Desenho experimental

Neste estudo foi avaliada a influência de três fatores sobre a toxicidade do TBT em sedimentos marinhos: (i) concentração da substância no sedimento; (ii) acidificação; e (iii) ressuspensão.

A faixa de concentrações de TBT em sedimento testada no presente estudo buscou abranger não apenas níveis ambientalmente relevantes, mas também aferir se os valores orientadores de risco ambiental de TBT em material dragado definidos em documentos regulatórios são adequados frente aos cenários testados. Portanto, a fim de abranger as concentrações ambientais observadas em trabalhos recentes (Borges *et al*, 2013; Moreira *et al*, 2013; Paz-Villarraga *et al*, 2015; 2016, Lofrano *et al.*, 2016; Lam *et al.*, 2017), cujos valores máximos foram de aproximadamente 3000 µg/kg de TBT, bem como os valores de intervenção para disposição de material dragado nos principais portos do mundo (ANZECC & ARMCANZ, 2000; OSPAR Commission, 2004; Brasil, 2012), que variam entre 60 e 1000 µg/kg, foram estabelecidas, inicialmente, quatro concentrações de TBT a serem testadas: 0 (controle de sedimento), 5, 50; 500 e 5000 µg/kg. Após a obtenção dos primeiros resultados, a concentração de 5000µg/kg foi substituída por 1000µg/kg.

O cenário de acidificação do meio marinho reproduzido no presente estudo é aquele projetado para o final do século corrente. Segundo Caldeira & Wickett (2005), os cenários acidificados previstos para 2100 indicam redução do pH em 0,3 a 0,5 unidades. Assim, os ensaios foram conduzidos no pH das amostras após a montagem do sistema (água + sedimento), cujo valor foi 7,6 e no pH mais acidificado previsto, reduzindo 0,5 desse valor, ou seja, de 7,1.

Por fim, o fator ressuspensão foi testado através do processo de elutriação dos sedimentos,

nas diferentes concentrações-teste, e utilizando água marinha de diluição nos diferentes pH testados. O processo de elutriação é normalmente empregado para simular a ressuspensão do sedimento em eventos de perturbação comuns na zona costeira, como dragagem, passagem de navios e rebocadores e tempestades. O controle negativo para o fator ressuspensão foi a realização de ensaios, nas mesmas condições aqui descritas, porém através da exposição ao sedimento integral no ensaio de interface sedimento-água.

## **2.2. Coleta e caracterização dos sedimentos**

Os sedimentos utilizados nos ensaios foram coletados no estuário do rio Itaguapé (-23,763 S e -45,773 O), localizado no município de Bertioga-SP. O local foi escolhido por se tratar de um estuário relativamente bem conservado do ponto de vista ambiental e não apresentar qualquer atividade que possibilite a incidência de TBT nas proximidades. Além disso, a área está inserida em três unidades de conservação e suas respectivas zonas de amortecimento, e o rio que compõe o sistema estuarino nasce dentro do Parque Estadual da Serra do Mar, corre pelo Parque Estadual Restinga de Bertioga e deságua na Área de Proteção Ambiental Marinha Litoral Centro. Os sedimentos coletados foram acondicionados em recipientes de plástico e armazenados em laboratório sob temperatura constante de 4 °C e ao abrigo da luz (CETESB, 2011).

Foram coletados sedimentos com diferentes tamanhos de grão, variando de predominantemente arenosos (coletados em área de praia) a predominantemente lamosos, provenientes de manguezais da foz do Rio Itaguapé. A fim de simular as características sedimentológicas de regiões portuárias (Fukumoto *et al*, 2004, Choueri *et al.*, 2009; Moreira, 2009), estes sedimentos foram misturados em laboratório em uma proporção de 20% de sedimento predominantemente lamoso e 80% de sedimento predominantemente arenoso. Para assegurar o teor mínimo de amônia nas amostras, cujos altos teores são naturalmente presentes em sedimentos de manguezal, todo o sedimento utilizado nos ensaios ecotoxicológicos foi

previamente seco em estufa a 60 °C por 3 dias.

Para sedimentologia, foram quantificados os teores de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e de matéria orgânica (MO). O carbonato de cálcio exerce forte influência sobre a textura do sedimento, aumentando sua porosidade e apresentando capacidade de seqüestrar a matéria orgânica (Leenheer & Reddy, 2008) e adsorver contaminantes, como alguns metais, tornando-os menos disponíveis à biota. A matéria orgânica no sedimento também possui a capacidade de alterar a biodisponibilidade de contaminantes devido a sua capacidade de adsorção, especialmente de substâncias hidrofóbicas (Gu *et al.*, 1994). Além disso, apresenta relevante papel ecológico por servir de alimento para os organismos detritívoros ou mesmo como base da cadeia trófica, além de ser importante devido ao consumo de oxigênio em seu processo de oxidação.

O teor de  $\text{CaCO}_3$  dos sedimentos foi estimado segundo o método descrito por Gross (1971). Foram utilizados 10 g de sedimento seco para digestão com ácido clorídrico 5N por cerca de 24 horas, para que o carbonato de cálcio fosse solubilizado. Posteriormente, as amostras foram lavadas com água destilada sobre papéis filtro cujos pesos foram previamente conhecidos. As amostras foram secas em estufa a 60 °C por 24 horas, e novamente pesadas. A diferença entre o peso final e o inicial corresponde à estimativa do teor de  $\text{CaCO}_3$ .

A determinação do teor de matéria orgânica foi feita através da adaptação do método de perda por ignição (Luczak *et al.*, 1997). Após a eliminação do  $\text{CaCO}_3$  (interferentes na análise de matéria orgânica) 5g de sedimento seco foram aquecidos em mufla a uma temperatura de 450°C por 4h. A porcentagem de matéria orgânica em cada amostra foi obtida com o através da seguinte equação:

$$\% \text{M.O.} = [(PI - PII) / PII] \times 100$$

Onde:

%MO = Teor de matéria orgânica;

PI = peso da amostra com a Matéria orgânica;

PII = o peso da amostra sem a Matéria orgânica;

### 2.3. Contaminação do sedimento (*spiking*)

A adição de contaminantes de forma controlada (fortificação ou, em inglês, *spiking*) em matrizes ambientais permite estabelecer uma relação de causa e efeito entre substâncias químicas e respostas biológicas (ASTM, 2008). No entanto, não há um protocolo único para a realização de *spiking* de sedimentos, apesar de diversos trabalhos empregarem esta abordagem. Dessa forma, a maioria dos autores adaptam à sua realidade as metodologias aplicadas em outros trabalhos, levando em conta as considerações e recomendações de cada um.

No presente trabalho, o *spiking* do sedimento com TBT foi realizado com base no trabalho de Pusceddu *et al.* (2017). Inicialmente o sedimento foi seco em estufa a 60 °C por 3 dias a fim de determinar seu teor de umidade e remover a amônia naturalmente presente no sedimento. As soluções estoque foram preparadas em acetona, devido à baixa solubilidade em água da substância analisada. Além disso, a acetona é amplamente utilizada como co-solvente em estudos ecotoxicológicos devido à sua alta volatilidade e baixa toxicidade (Canty *et al.*, 2007 e Tao *et al.*, 2013).

Em bandejas de aço inox, alíquotas de sedimento seco foram pesadas e a elas foram acrescidas a quantidade original de água evaporada na secagem já enriquecida com a solução do contaminante na concentração de TBT desejada, para que correspondesse às concentrações finais de 5, 50, 500 e 5000 (ou 1000) µg/kg de sedimento seco. O sedimento contaminado foi agitado manualmente durante 30 minutos, transferidos para frascos de vidro previamente limpos. Em seguida, os frascos foram tampados e envolvidos com papel alumínio para evitar a degradação do TBT e deixados por 3 dias em geladeira, a 4 °C para que o contaminante entrasse em equilíbrio com o sedimento e a água intersticial.

## 2.4. Acidificação

Para simular os efeitos da acidificação da água do mar foi utilizado, para exposição dos organismos, um sistema de injeção de CO<sub>2</sub> dentro de uma caixa plástica fechada e aerada artificialmente, como apresentado no esquema abaixo (sistema de caixa hermética) (Figura 1).

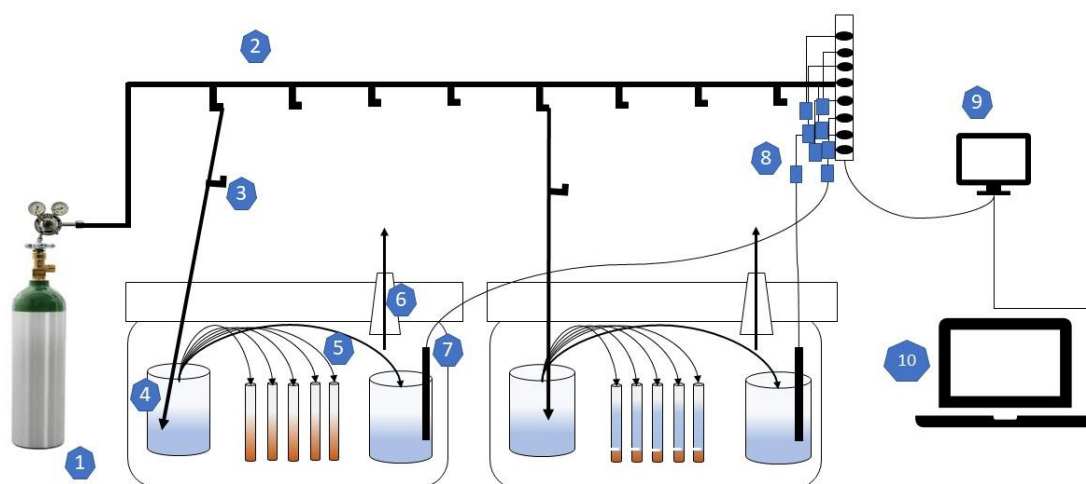


Figura 1. Representação esquemática do sistema de injeção de CO<sub>2</sub> em caixa hermética. (1) cilindro de CO<sub>2</sub>; (2) cano de distribuição do gás; (3) regulador; (4) béquer com água onde o CO<sub>2</sub> é injetado; (5) distribuição de CO<sub>2</sub> por difusão; (6) troca gasosa; (7): sensor de pH ligado a interface (8) que o conecta ao sistema de controle (9); 10: Laptop com software Aqua Medic.

O sistema foi baseado no trabalho de Kita *et al.* (2013), onde o CO<sub>2</sub> foi injetado em um béquer contendo apenas água destilada e, por difusão, o gás foi incorporado aos béqueres onde se deu a exposição dos organismos ao contaminante. Isso evita que o borbulhamento de CO<sub>2</sub> possa interferir nas respostas biológicas avaliadas. Os valores de pH foram mantidos ao longo do tempo de exposição através do sistema automático de injeção de CO<sub>2</sub>, controlado por um computador composto por um software (AquaMedic) e conectado ao sensor de pH colocado em um segundo béquer com elutriado do sedimento controle dentro da caixa. Ao exceder 0,01 do valor estabelecido, o sistema injeta automaticamente CO<sub>2</sub>, mantendo pH controlado no tempo de exposição dos ensaios.

A acidificação da água do mar altera substancialmente o balanço do sistema carbonato, i.e. concentrações de alcalinidade total, carbono inorgânico total, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, CO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>,

saturações ( $\Omega$ ) de aragonita e calcita. Desta forma, foi caracterizada a especiação do sistema carbonato em todos os ensaios, tanto nos tratamentos contaminados quanto nos controles de contaminação. A alcalinidade total foi medida na água, após o tempo de exposição, através de titulação com HCl (0,1M) e auxílio de titulador automático (Hanna HI 901). Utilizando-se os dados provenientes das análises de pH e alcalinidade total, foi estimada a especiação do sistema carbonato, utilizando-se o programa CO<sub>2</sub>SYS (Pierrot *et al.*, 2006), com escala de pH NBS ( $\text{mol kg}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ ) e constante dissociação de Mehrbach *et al.* (1973), adaptado por Dickson & Millero (1987).

### **2.5. Sedimento integral (*Nitokra* sp.)**

O ensaio de toxicidade crônica com sedimento integral foi realizado utilizando fêmeas ovígeras do copépodo harpacticoide *Nitokra* sp. provenientes do cultivo mantido pelo laboratório. O experimento foi conduzido de acordo com o protocolo adaptado por Lotufo & Abessa (2002) para copépodos bentônicos do gênero *Nitokra* sp.

Foram utilizados béqueres de vidro de 30mL para montagem das câmaras-teste, contendo 5mL de sedimento fortificado com TBT nas concentrações determinadas e 20mL de água de diluição filtrada, em salinidade 17. Os frascos permaneceram em repouso por 24 horas para que o sedimento decantasse e estabilizasse. Quatro réplicas foram preparadas para cada amostra de sedimento. Foram adicionadas 7 fêmeas ovígeras a cada réplica e, posteriormente, 0,1mL de uma mistura de ração de peixe. O ensaio foi mantido com temperatura de  $25(\pm 2)^\circ\text{C}$ , sem aeração e foto-período de 12h:12h (luz:escuridão) durante 4 dias. Os parâmetros físico-químicos da água, oxigênio dissolvido, salinidade e temperatura foram mensurados no início e ao final do ensaio e amônia somente no final. Ao final do período de teste, as réplicas foram fixadas com 0,5mL formaldeído 10% e coradas com 0,5mL de solução alcoólica de Rosa de Bengala 1%. O efeito sobre a reprodução foi analisado através da contagem de náuplios e

copepoditos e o resultado da soma de ambos foi dividido pelo número de fêmeas adultas encontradas.

## **2.6. Elutriação**

Para os ensaios de elutriação, foram adicionados aos sedimentos 950mL de água do mar reconstituída e filtrada, em salinidade 35. Os sistemas sedimento contaminado + água do mar, em uma proporção de 1:4, bem como os sistemas com sedimento controle e controle acetona, foram submetidos à acidificação por injeção de CO<sub>2</sub> da mesma forma já descrita, utilizando o sistema de caixa fechada, para que atingisse o pH 7,1 antes da elutriação. Os sistemas destinados aos ensaios em pH controle não foram acidificados. Após atingir estabilidade nos pHs desejados, a elutriação foi feita através de agitação mecânica por 30 minutos em cada sistema teste e, sem seguida, permaneceu em descanso para decantação do sedimento durante 24 horas. A extração das alíquotas do elutriado foi feita cuidadosamente e então acomodadas nas unidades experimentais (béqueres de 30mL), onde ocorreu a exposição dos embriões de ouriço-do-mar. Os parâmetros físico-químicos oxigênio dissolvido, temperatura, salinidade e amônia foram mensurados no início e final dos ensaios.

## **2.7. Interface Sedimento-Água**

Devido a processos como fluxo potencial de água intersticial do sedimento para a água de coluna, a deposição de materiais provenientes da coluna d'água, a remineralização da matéria orgânica no sedimento, e a solubilização de contaminantes antes precipitados ou adsorvidos ao sedimento, a ISA pode ser uma importante fonte de contaminação para a coluna d'água e um provável local de exposição para organismos epibentônicos, caracterizando assim um habitat ecologicamente relevante (Anderson *et al.*, 2001). Para exposição dos organismos na interface sedimento-água foi utilizado procedimento desenvolvido por Cesar (2003) (Figura 2), adaptado de Anderson *et al.* (1996), com ajuste de volume para béqueres de 30ml.



Foram adicionados a cada unidade experimental (4 réplicas por amostra) 5mL de sedimento a ser testado. Sobre o sedimento foi colocada uma rede de plâncton de 45µm fixada por um anel plástico esterilizado. Posteriormente foram adicionados 20mL de água marinha de diluição ao sistema, que permaneceu a uma temperatura de 25 °C durante 24h, para que ocorresse o equilíbrio entre o sedimento inicialmente refrigerado e a água adicionada. Os parâmetros físico-químicos oxigênio dissolvido, temperatura, pH, salinidade e amônia foram mensurados no início e final dos ensaios.

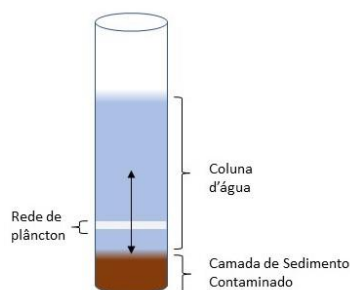


Figura 2. Representação do sistema de ISA. A seta representa o possível fluxo de contaminantes.

Posteriormente foram adicionados a cada réplica os organismos-teste de acordo com os procedimentos detalhados a seguir.

## 2.8. Ensaio de desenvolvimento embrio-larval (*Echinometra lucunter*)

O ensaio empregado no presente estudo para avaliar ecotoxicidade das matrizes aquosas foi realizado com ovos recém-fecundados de ouriço do mar da espécie *Echinometra lucunter*. O protocolo para ensaios de ecotoxicidade com água do mar utilizando ovos de ouriço foi desenvolvido por Kobayashi (1971).

Os indivíduos adultos foram coletados na Ilha das Palmas, Santos-SP, por meio de mergulho livre. Em laboratório, os organismos foram mantidos em tanques contendo água do mar e algas coletadas no mesmo local, bem como aeração constante. A extração e a fecundação dos gametas foram conduzidas de acordo com a NBR 15350 (ABNT, 2012). A desova foi

estimulada por choque osmótico com injeção de KCl (0,5M). Foram utilizados ao menos 3 indivíduos de cada sexo para manutenção da variabilidade dos gametas. O sexo foi confirmado pela coloração dos gametas no momento da liberação.

Os espermatozoides foram acondicionados em um béquer mantido em placa de Petri com gelo e posteriormente ativados com água de diluição, em uma proporção de 0,5mL de esperma para 24,5mL de água, imediatamente antes da fecundação. Os óvulos foram analisados em microscópio para avaliar sua viabilidade, de acordo com o estágio de maturação e a morfologia. Os óvulos viáveis foram acondicionados em um béquer contendo água marinha de diluição e lavados 3 vezes. Para fecundação foi adicionado de 1 a 2mL de suspensão de esperma no béquer com óvulos. Os ovos foram utilizados para o teste quando atingida uma taxa de fecundação mínima de 80%.

Os meios experimentais constituíram-se de béqueres contendo 30mL de meio de exposição. A cada réplica foram adicionados de 500 ovos recém-fecundados. O experimento foi mantido por até 42 horas sob fotoperíodo de 12hrs:12hrs (luz:escuro) e temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ . Para encerrar o teste, foi utilizado formol 40% tamponado. As larvas foram contadas e analisadas em microscópio óptico sob aumento de 40x, utilizando uma câmara de Sedgwick-Rafter com aproximadamente 1mL de amostra. Para cada réplica foram contadas as 100 primeiras larvas, contabilizando as que apresentaram desenvolvimento anormal, retardado ou deformações, bem como as normais que atingiram o estágio de *pluteus*. O teste de referência para larvas de ouriço foi feito com sulfato de zinco de acordo com a NBR 15350 (ABNT, 2006). A substância foi dissolvida com água de diluição, em concentrações de 0,5; 0,1; 0,05; 0,01mg/L. A CE50 de sulfato de zinco para *Echinometra lucunter* deverá encontrar-se no intervalo delimitado por duas vezes o desvio padrão em relação aos valores médios obtidos anteriormente para a mesma espécie.

## 2.9. Análise dos dados

As concentrações de efeito (CE-50) do contaminante em cada tratamento foram estimadas utilizando método Trimmed Spearman-Kärber com método de correção de Abbot (Hamilton *et al.*, 1977).

Os dados foram analisados quanto a normalidade (teste de chi-quadrado) e homogeneidade de variâncias (teste de Bartlett). Como os pressupostos para realização de teste paramétrico não foram atendidos, a comparação dos resultados de toxicidade com os valores de pH e ocorrência de perturbação foram analisados através de uma PERMANOVA (análise de variância permutacional) a fim de testar o efeito dos fatores: (1) contaminação, com seis níveis: dois controles sem adição de TBT (controle de sedimento e controle de sedimento mais acetona) e 4 concentrações de TBT; (2) acidificação, com dois níveis (pH normal 7,6 *versus* pH ácido 7,1) e; (3) “ressuspensão” com dois níveis (elutriado *versus* interface sedimento-água). O efeito dos fatores “contaminação” e “acidificação” e interações foram analisados nos ensaios com sedimento integral, elutriado e interface. O fator “ressuspensão” e interações com “contaminação” e “acidificação” foi incluído para os ensaios de elutriado e interface apenas, assim como a interação entre eles. Em caso de efeito significativo de qualquer fator ou interação ( $\alpha=5\%$ ), testes pareados foram realizados para identificar quais tratamentos são diferentes entre si, utilizando permutação de Monte Carlo. Para todos os testes, as matrizes de distância foram feitas com base em distância Euclideana.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Caracterização do sedimento

A análise granulométrica de acordo com a classificação de Wentworth (1922) indicou predominância das frações de areia muito fina (58%) e areia fina (40,1%). As frações de

silte/argila e areia média representaram 1,1 e 1,4%, respectivamente. As frações mais grossas (areia grossa, areia muito grossa e cascalho) somaram 0,6% da amostra de sedimento.

A média dos teores de  $\text{CaCO}_3$  e Matéria Orgânica observados nas amostras de sedimento foram 2,18 e 0,74%, respectivamente. Esses valores são considerados baixos, mas não surpreendem dado teor de areia (80%) utilizado.

### 3.2. Especiação Sistema Carbonato

Os valores obtidos na análise de especiação do sistema carbonato das amostras de elutriado e interface sedimento em ambos os cenários de acidificação avaliados são apresentados na Tabela 1.

A acidificação dos sistemas aquáticos através da difusão do  $\text{CO}_2$  devido ao enriquecimento da atmosfera por este gás gera desequilíbrio do sistema de carbono inorgânico dos oceanos, responsável pelo controle do pH da água do mar (Fabry *et al.*, 2008). A reação entre as moléculas de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  resultam na formação de ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) que, extremamente instável, rapidamente se dissocia em íons  $\text{H}^+$  e bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). Os íons  $\text{H}^+$ , por sua vez, podem se associar ao carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) para formar o bicarbonato, indisponibilizando o carbonato para os processos fisiológicos de calcificação dos organismos. Como apresentado na Tabela 1, o aumento da pressão de  $\text{CO}_2$  reduz o pH das amostras e aumenta a concentração de carbono inorgânico total. A injeção de  $\text{CO}_2$  leva à sub-saturação de calcita e aragonita, influenciando no balanço de carbonatos na água do mar.

Apesar de não verificado no presente estudo, a redução do pH pode prejudicar o desenvolvimento embriolarval de espécies de equinodermas (Kurihara & Shirayama, 2004) devido à sub-saturação de carbonatos. O exoesqueleto da larva *pluteus* é formado de carbonato de cálcio (Okazaki & Inoue, 1976), cuja assimilação é reduzida em ambientes acidificados, comprometendo o crescimento dos indivíduos (Kurihara & Shirayama, 2004). A longo prazo,

os impactos sobre esse grupo, que possui importante papel na ecologia de diversos ecossistemas costeiros (Carpenter 1986; Williams & Carpenter 1988) pode ter grande reflexo na biodiversidade marinha (Kurihara *et al*, 2004).

Tabela 1. Especificação do sistema carbonato para os ensaios de elutriação e interface sedimento água nos diferentes cenários de acidificação. AT: Alcalinidade total, CIT: Carbono Inorgânico total,  $\text{HCO}_3^-$ : Bicarbonato,  $\text{CO}_3^{2-}$ : Carbonato;  $\text{pCO}_2$ : Pressão parcial de  $\text{CO}_2$ ;  $\Omega$  Cal: Estado de saturação para calcita;  $\Omega$  Arag: Estado de saturação para aragonita.

			AT ( $\mu\text{mol/kg}$ )	$\text{pCO}_2$	CIT ( $\mu\text{mol/kg}$ )	$\text{HCO}_3^-$ ( $\mu\text{mol/kg}$ )	$\text{CO}_3$ ( $\mu\text{mol/kg}$ )	$\Omega$ Cal	$\Omega$ Arag
Elutriado (preliminar)	pH 7,1	Controle	1151,7	2647,1	1221,2	1112,2	14,0	0,35	0,23
		C. Acet.	1112,2	2854,8	1173,7	1073,8	13,4	0,33	0,22
		TBT_5	1142,7	2913,4	1202,4	1103,3	13,9	0,35	0,23
		TBT_50	1143,1	2974,4	1204,4	1103,8	13,9	0,34	0,22
		TBT_500	1207,7	2942,9	1266,6	1166,4	14,8	0,37	0,24
		TBT_5000	1215,5	3003,4	1275,6	1174,7	14,7	0,36	0,24
	pH 7,6	Controle	1013,9	802,9	969,9	907,4	35,9	0,89	0,58
		C. Acet.	1156,8	825,6	1105,9	1039,8	41,2	1,02	0,67
		TBT_5	1133,8	873,5	1085,1	1019,2	40,1	0,99	0,65
		TBT_50	1177,8	835,4	1126,5	1060,4	41,5	1,03	0,67
		TBT_500	1250,5	878,3	1195,6	1125,1	45,2	1,12	0,73
		TBT_5000	1178,9	841,7	1127,0	1061,0	41,7	1,03	0,67
Elutriado	pH 7,1	Controle	1494,0	3089,0	1568,2	1452,9	15,0	0,36	0,23
		C. Acet.	1560,7	3160,9	1625,5	1508,2	19,6	0,47	0,31
		TBT_5	1584,3	3251,0	1647,0	1529,2	20,7	0,49	0,32
		TBT_50	1616,4	3307,0	1678,4	1560,3	21,2	0,50	0,33
		TBT_500	1598,0	3258,5	1658,4	1542,0	21,1	0,50	0,33
		TBT_1000	1627,6	3235,5	1684,7	1570,0	21,8	0,52	0,34
	pH 7,6	Controle	1505,0	1089,3	1453,9	1369,6	49,6	1,17	0,76
		C. Acet.	1532,4	991,2	1466,5	1379,2	56,7	1,35	0,88
		TBT_5	1616,1	949,4	1541,9	1452,4	61,5	1,46	0,96
		TBT_50	1547,0	962,9	1475,6	1388,2	59,0	1,40	0,92
		TBT_500	1621,5	968,9	1544,2	1452,7	63,5	1,51	1,00
		TBT_1000	1555,7	953,7	1480,4	1392,2	60,9	1,45	0,95
Interface	pH 7,1	Controle	1711,2	2178,8	1742,8	1660,1	19,4	0,46	0,30
		C. Acet.	1735,0	2102,3	1762,3	1680,0	21,0	0,50	0,33
		TBT_5	1772,9	2162,7	1799,6	1714,4	22,5	0,54	0,35
		TBT_50	1797,3	2162,4	1823,0	1736,8	23,4	0,56	0,37
		TBT_500	1770,3	2289,1	1799,4	1710,3	23,1	0,55	0,36
		TBT_1000	1752,3	2298,5	1781,9	1691,3	23,5	0,56	0,37
	pH 7,6	Controle	2020,9	561,8	1929,7	1843,2	70,1	1,66	1,08
		C. Acet.	1836,6	643,8	1750,7	1665,9	66,0	1,57	1,02
		TBT_5	1753,0	630,3	1663,9	1578,7	66,8	1,59	1,04
		TBT_50	1777,3	655,4	1688,0	1601,1	67,8	1,61	1,06
		TBT_500	1785,2	698,2	1694,1	1604,4	69,6	1,66	1,09
		TBT_1000	1756,4	656,2	1664,2	1575,6	69,4	1,65	1,09

### 3.3. Ensaios de Toxicidade

#### 3.3.1. Ensaio de sedimento integral

No ensaio de sedimento integral, os parâmetros físico-químicos oxigênio dissolvido (O.D.), salinidade (Sal) e temperatura (Temp) mantiveram-se dentro dos limites estabelecidos pelo protocolo desenvolvido por Lotufo e Abessa (2002) para *Nitokra* sp. (Tabela 2). Os valores de amônia não-ionizada variaram entre 0,04 e 0,212 mg/L. Apesar de considerados altos ( $>0,05\text{mg/L}$ ) e potencialmente tóxicos para alguns organismos, como embriões de ouriço do

mar (Prósperi, 2002), essas concentrações de amônia não ionizada não são limitantes para a sobrevivência e reprodução de copépodos bentônicos estuarinos, como o modelo utilizado (Sousa *et al*, 2011).

Tabela 2. Resultados do ensaio de toxicidade com sedimento integral e os parâmetros físico-químicos analisados (OD= Oxigênio Dissolvido, Sal= Salinidade, Temp= Temperatura, NH<sub>3</sub>= Amônia Não Ionizada)

		Sedimento Integral												
		(Nauplios+Copepoditos)/Fêmea						O.D. (mg/L)		Sal		Temp (°C)		NH3
	Amostra	R1	R2	R3	R4	Média	DP	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Final
pH 7,6	Controle Sedimento	10,71	12,14	13,29	6,33	<b>10,62</b>	3,04	5,17	4,19	19	19	25	25	0,107
	Controle Acetona	12,57	13,29	12,43	12,43	<b>12,68</b>	0,41	4,99	3,5	19	19	25	25	0,137
	TBT 5 µg/Kg	6,00	9,29	9,14	11,29	<b>8,93</b>	2,18	5,03	3,53	19	19	25	25	0,212
	TBT 50 µg/Kg	9,00	8,43	11,00	8,86	<b>9,32</b>	1,15	4,93	4,02	19	19	25	25	0,217
	TBT 500 µg/Kg	5,86	6,00	7,14	7,00	<b>6,50</b>	0,66	5,01	3,15	19	19	25	25	0,189
	TBT 1000 µg/Kg	0,71	0,20	0,71	0,33	<b>0,49</b>	0,26	5,2	3,51	19	19	25	25	0,209
pH 7,1	Controle Sedimento	2,60	4,67	4,33	6,86	<b>4,61</b>	1,75	5,07	3	18	17	25	25	0,04
	Controle Acetona	12,29	9,29	8,71	7,71	<b>9,50</b>	1,97	4,07	3,01	18	18	25	25	0,05
	TBT 5 µg/Kg	5,43	3,86	6,14	4,71	<b>5,04</b>	0,98	4,12	3,31	18	18	25	25	0,041
	TBT 50 µg/Kg	3,50	4,43	3,57	7,00	<b>4,63</b>	1,64	4,01	3,13	18	17	25	25	0,054
	TBT 500 µg/Kg	5,14	4,11	3,44	5,14	<b>4,46</b>	0,83	4,62	3,1	18	17	25	25	0,052
	TBT 1000 µg/Kg	0,00	0,33	0,25	0,14	<b>0,18</b>	0,14	4,73	3,88	18	17	25	25	0,062

Os resultados de fecundidade obtidos das amostras contaminadas com TBT foram comparadas com o controle sedimento+acetona, uma vez que houve diferença significativa entre o controle sedimento e controle sedimento+acetona ( $p < 0,05$ ). Apesar de não haver estudos específicos que indiquem o mecanismo de ação, outros trabalhos, assim como o presente estudo, observaram que a presença da acetona causa aumento da prole por fêmea (Stringer *et al*, 2014; Morais, 2016). Dessa forma, optou-se pelo uso do controle sedimento+acetona pois este representa o cenário mais próximo das amostras contaminadas com TBT, cuja solução estoque para *spiking* foi feita em acetona.

Tabela 3. Resultados da análise de PERMANOVA avaliando efeito da contaminação de TBT, pH do meio e interação destes fatores sobre a fertilidade de *Nitokra* sp. Valores destacados em negrito indicam  $p < 0.05$

Sedimento integral ( <i>Nitokra</i> sp)												
	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)							
Contaminação	5	491,97	98,395	42,252	<b>0,001</b>							
pH	1	134,16	134.16	57,608	<b>0,001</b>							
Contaminação vs. pH.	5	38,868	7,7735	3,338	<b>0,012</b>							
Residual	35	81,507	2,3288									
Permanova - Pair-Wise Test												
pH 7,1			pH 7,6									
	t	p (Perm)	t	p (Perm)								
Controle vs Controle Acetona	3,7068	<b>0,029</b>	1,3416	0,231								
Controle Acetona vs TBT 5µg/kg	4,0591	<b>0,036</b>	3,3724	<b>0,030</b>								
Controle Acetona vs TBT 50µg/kg	3,8035	<b>0,022</b>	5,5211	<b>0,021</b>								
Controle Acetona vs TBT 500µg/kg	4,7117	<b>0,026</b>	15,427	<b>0,041</b>								
Controle Acetona vs TBT 5000µg/kg	9,4316	<b>0,023</b>	49,926	<b>0,033</b>								
TBT 5µg/kg vs TBT 50µg/kg	0,42978	0,697	0,31821	0,949								
TBT 5µg/kg vs TBT 500µg/kg	0,89908	0,413	1,67	0,15								
TBT 5µg/kg vs TBT 5000µg/kg	9,8342	<b>0,035</b>	7,6711	<b>0,032</b>								
TBT 50µg/kg vs TBT 500µg/kg	0,18217	0,852	3,523	<b>0,033</b>								
TBT 50µg/kg vs TBT 5000µg/kg	5,404	<b>0,027</b>	15,051	<b>0,033</b>								
TBT 500µg/kg vs TBT 5000µg/kg	10,108	<b>0,03</b>	18,417	<b>0,026</b>								
Controle		Controle Acetona		TBT 5µg/kg		TBT 50µg/kg		TBT 500µg/kg		TBT 5000µg/kg		
	t	p(Perm)	t	p(Perm)	t	p(Perm)	t	p(Perm)	t	p(Perm)	t	p(Perm)
pH 7,1 vs pH 7,6	3,4167	<b>0,051</b>	3,1583	<b>0,031</b>	3,2542	0,068	4,7003	<b>0,032</b>	3,9048	<b>0,037</b>	2,0581	0,142

Como apresentado na Tabela 3, foi observada diferença estatística ( $p < 0,05$ ) para ambos os fatores analisados (pH e Contaminação), bem como para a interação entre eles. Os resultados da análise *Pair wise* da PERMANOVA, apresentados na Figura 3 e na Tabela 3, indicaram que para cada concentração testada houve efeito do pH sobre a toxicidade do TBT (números acima das barras de erro) para a fecundidade de *Nitokra* sp., exceto na concentração de 5000µg/kg. Este efeito do pH foi observado também para as amostras não contaminadas (Controle e Controle+acetona), indicando efeito isolado do fator “acidificação”, na ausência do contaminante.

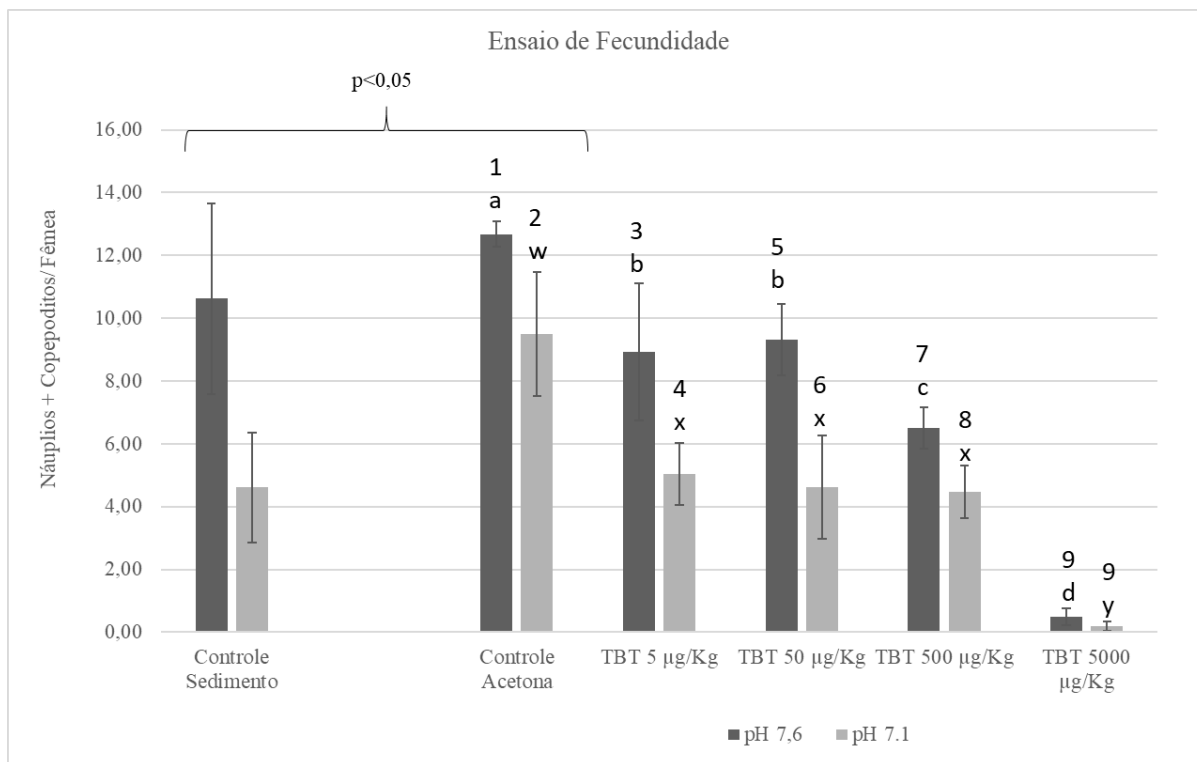


Figura 3. Ensaio de fecundidade de *Nitokra* sp com amostras de sedimento integral. As letras acima das barras de desvio padrão representam as diferenças significativas para o fator “nível de contaminação”. Os números acima das barras de erro representam as diferenças significativas para o fator “pH” dentro de cada concentração ( $p < 0,05$ ).

A análise do fator “contaminação” (letras acima das barras de erro) indicou que, em ambos os pHs testados, todas as concentrações de TBT apresentaram toxicidade sobre a fecundidade de *Nitokra* sp. quando comparadas ao controle sedimento+acetona ( $p < 0,05$ ). No entanto, é preciso chamar a atenção para o fato de que, em todas as concentrações, as distâncias dos tratamentos contaminados foram maiores em relação ao seu respectivo controle no pH 7,1 em comparação ao pH 7,6. Considerando tais resultados, é possível inferir que o pH interage com o nível de contaminação de TBT, uma vez que em ambientes mais ácidos a toxicidade é agravada quando comparada à mesma concentração de TBT em um ambiente não acidificado.

Estudos anteriores observaram que a toxicidade do TBT pode variar muito entre diferentes organismos e respostas selecionadas (Fent, 1996, Meador e Rice, 2001; Bartlett *et al*, 2004; Dwivedi & Trombetta, 2006, Perina, 2009;). Os resultados obtidos acerca da toxicidade do TBT no presente estudo são similares aos obtidos por Langston *et al*. (1990), Langston &



Burt (1991), Ruiz *et al.* (1994) que observaram efeito tóxico para *Scrobicularia plana* em concentrações de 300µg/Kg. Em concentrações de aproximadamente 500µg/Kg, o TBT apresentou efeito sobre a reprodução de *Hyalella azteca* (Bartlett *et al.*, 2004), assim como foi observado no presente estudo para *Nitokra* sp. Kwok & Leoung (2005) observaram que o aumento da salinidade reduz a toxicidade do TBT.

Apesar do cenário contemporâneo já ser crítico para o TBT, uma vez que concentrações superiores às comprovadamente tóxicas são comumente encontradas no ambiente (Bhosle *et al.*, 2004; Viglino *et al.*, 2006; Berto *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2009; Abidli *et al.*, 2011; Castro & Fillamnn, 2012; Castro *et al.*, 2012; Artifon *et al.*, 2016), o prognóstico das condições ambientais futuras se mostra potencialmente pior. Os resultados obtidos no presente estudo com relação à toxicidade crônica em ambientes acidificados indicaram que até mesmo a concentração mais baixa (5 µg/Kg) causou efeito considerável sobre a fecundidade de *Nitokra* sp.

A redução do pH de forma isolada é capaz de exercer efeitos adversos na fecundidade de *Nitokra* sp. mesmo na ausência de contaminação, como observado nos controles negativos. Em estudo com múltiplas gerações, Fitzer *et al.* (2012) indicaram que o aumento da acidez aumenta a proporção de carbono com relação ao oxigênio na cutícula de copépodos harpacticoides e o estresse causado pela redução do pH pode causar aumento inicial do número de náuplios, mas ao longo das gerações o crescimento somático dos organismos é reduzido, comprometendo as populações a longo prazo. Neste mesmo estudo, foi observado que a produção naupliar é comprometida pela realocação energética sobre a cutícula, uma vez que em ambientes acidificados, as concentrações de carbono e oxigênio da cutícula diminuem quando do aumento da produção naupliar e aumentam com a redução da prole.

A exemplo do presente estudo, diversos outros estudos vêm observando que os efeitos da

acidificação dos oceanos magnificam a toxicidade de contaminantes. Campbell *et al.* (2014) observaram que a mobilidade de espermatozoides e sobrevivência de larvas do poliqueto *Arenicola marina* são reduzidas quando expostos a um pH de 7,4 num sedimento contaminado por cobre. Em outro estudo, larvas de mexilhão submetidos a contaminação por pesticida resmethrin sofreram efeito letal em concentrações menores do contaminante quando expostas a um pH de 7,9 em comparação à exposição ao pH 8,2 (Garcia *et al.*, 2014). Pascal *et al.* (2010) também observou que a redução do pH aumenta a toxicidade de cobre e cádmio para o copépodo *Amphiascoides atopus*.

Além dos efeitos observados com relação ao nível de contaminação por TBT e à acidificação do meio, os resultados também indicaram que esses fatores interagem entre si ( $p < 0,05$ ), onde a redução do pH intensifica a toxicidade causada pelo aumento da concentração de TBT no sedimento. Tal efeito pode ter relação com o aumento da permeabilidade da membrana celular (Rendal *et al.*, 2011), que estaria associado ao aumento do transporte passivo da fração solúvel de TBT para o interior das células dos organismos, uma vez que na condição de salinidade utilizada para a exposição (17), a solubilidade do TBT em água é aumentada (Langstone Pope, 1995; Burton *et al.* 2004). Apesar do exoesqueleto quitinoso, esta estrutura possui poros que permitem a passagem de substâncias tóxicas (Hagopian-Schlekat, 2001).

Além da exposição dérmica pelo aumento da permeabilidade da membrana em ambientes acidificados e aumento das frações mais solúveis de TBT, dadas as condições de pH e salinidade, a fração hidrofóbica (TBTCl) presente é adsorvida pela matéria orgânica associada ao sedimento. No caso de organismos bentônicos com hábito detritívoro, como *Nitokra* sp., a adsorção de contaminantes ao sedimento pode aumentar exposição dos indivíduos pela via alimentar (Lotufo e Abessa, 2002).

### 3.3.2. Ensaios de elutriação e interface sedimento água

No presente estudo foram realizados dois ensaios de elutriação, sendo um em caráter preliminar e um definitivo. No ensaio preliminar, as maiores médias de desenvolvimento embriolarval normal foram obtidas nos tratamentos controle sedimento+acetona em pH acidificado e na menor concentração de TBT do pH controle (69 e 73%, respectivamente, de desenvolvimento embriolarval normal). O teste com substância de referência indicou elevada sensibilidade do lote organismos em relação ao sulfato de zinco, o que corrobora com os valores de desenvolvimento embriolarval normal pouco abaixo do desejável para ensaios deste tipo (ABNT NBR 15350).

Os parâmetros físico-químicos mensurados no início e ao final do ensaio também indicaram que as condições de oxigênio dissolvido, salinidade, temperatura e amônia não ionizada não foram limitantes para o desenvolvimento embriolarval dos organismos (ABNT, 2006) (Tabela 5).

Tabela 4. Resultados do ensaio preliminar de toxicidade com elutriado e os parâmetros físico-químicos analisados (OD= Oxigênio Dissolvido, Sal= Salinidade, Temp= Temperatura e NH<sub>3</sub>= Amônia Não Ionizada)

		Elutriado (Preliminar)													
		Desenvolvimento Embriolarval (%)						O.D. (mg/L)		Sal		Temp (°C)		NH <sub>3</sub> (mg/L)	
	Amostra	R1	R2	R3	R4	Média	DP	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
pH 8,2 (controle)	Controle Sedimento	63	52	47	63	<b>56,3</b>	8,1	5,56	3,76	31	30	25	25	0,011	0,011
	Controle Acetona	66	66	62	44	<b>59,5</b>	10,5	6,04	4,18	31	30	25	25	0,011	0,011
	TBT 5 µg/Kg	68	79	77	69	<b>73,3</b>	5,6	5,74	3,87	31	30	25	25	0,015	0,012
	TBT 50 µg/Kg	45	44	41	49	<b>44,8</b>	3,3	5,54	4,03	31	30	25	25	0,014	0,011
	TBT 500 µg/Kg	9	10	10	4	<b>8,3</b>	2,9	5,3	4,14	31	30	25	25	0,013	0,014
	TBT 5000 µg/Kg	0	0	0	0	<b>0,0</b>	0,0	6,07	3,8	31	30	25	25	0,011	0,009
pH 7,6 (acidificado)	Controle Sedimento	69	66	63	35	<b>66,0</b>	3,0	5,55	4,13	31	30	25	25	0,039	0,033
	Controle Acetona	68	69	59	80	<b>69,0</b>	8,6	5,6	3,75	31	30	25	25	0,044	0,035
	TBT 5 µg/Kg	68	60	63	61	<b>63,0</b>	3,6	6,45	3,9	30	30	25	25	0,041	0,041
	TBT 50 µg/Kg	61	50	56	52	<b>54,8</b>	4,9	6,4	4,5	31	30	25	25	0,038	0,034
	TBT 500 µg/Kg	3	2	3	0	<b>2,0</b>	1,4	6,21	3,57	31	30	25	25	0,040	0,039
	TBT 5000 µg/Kg	0	0	0	0	<b>0,0</b>	0,0	6,05	3,73	31	30	25	25	0,001	0,037

Os tratamentos “controle sedimento” e “controle sedimento+acetona” não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) com relação ao desenvolvimento embriolarval, portanto, para se avaliar a toxicidade das amostras com TBT, os resultados obtidos nos tratamentos de

sedimento contaminados com TBT foram comparados aos resultados do controle de sedimento+acetona, uma vez que este representa o cenário mais próximo das amostras contaminadas com TBT.

*Tabela 5. Resultados da análise de PERMANOVA avaliando efeito da contaminação de TBT, pH do meio e interação destes fatores sobre o desenvolvimento embriolar de Echinometra lucunter no ensaio preliminar. Valores destacados em negrito indicam  $p < 0.05$*

Elutriado Piloto ( <i>Echonometra lucunter</i> )					
	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
Contaminação	5	36677	7335,3	150,77	<b>0,001</b>
pH	1	8,3333	8,3333	0,17128	0,711
Contaminação vs. pH.	5	668,42	133,68	2,7477	<b>0,034</b>
Residual	36	1751,5	48,653		
Permanova - Pair-Wise Test					
	pH 7,6			pH 8,2	
	t	p (Perm)	t	p (Perm)	
Controle vs Controle Acetona	1,2014	0,389	0,491	0,784	
Controle Acetona vs TBT 5µg/kg	1,289	0,348	2,3139	<b>0,030</b>	
Controle Acetona vs TBT 50µg/kg	2,8851	<b>0,044</b>	2,6791	0,1	
Controle Acetona vs TBT 500µg/kg	15,371	<b>0,026</b>	9,4127	<b>0,029</b>	
Controle Acetona vs TBT 5000µg/kg	16,042	<b>0,026</b>	11,329	<b>0,028</b>	
TBT 5µg/kg vs TBT 50µg/kg	2,7405	0,087	8,8128	<b>0,026</b>	
TBT 5µg/kg vs TBT 500µg/kg	31,856	<b>0,032</b>	20,772	<b>0,044</b>	
TBT 5µg/kg vs TBT 5000µg/kg	35,403	<b>0,037</b>	26,348	<b>0,023</b>	
TBT 50µg/kg vs TBT 500µg/kg	20,858	<b>0,022</b>	16,674	<b>0,035</b>	
TBT 50µg/kg vs TBT 5000µg/kg	22,548	<b>0,027</b>	27,088	<b>0,039</b>	
TBT 500µg/kg vs TBT 5000µg/kg	2,8284	0,161	5,7446	<b>0,027</b>	
Controle	Controle Acetona		TBT 5µg/kg		TBT 5000µg/kg
	t	p(Perm)	t	p(Perm)	t
pH 7,6 vs pH 8,2	0,22676	0,824	1,3994	0,293	3,1052
			0,055	3,405	<b>0,026</b>
TBT 50µg/kg					

Para o ensaio de elutriado não foi observada a influência isolada da acidificação sobre a toxicidade das amostras ( $p > 0,05$ ). Antes da ressuspensão, as amostras foram mantidas durante 12 horas nos pHs pré-determinados: 7,6 (acidificado) e 8,2 (controle), o que poderia alterar a disponibilização do TBT na coluna d'água durante o processo de elutriação. Apesar dos pHs iniciais diferentes, após a elutriação os pHs finais se acidificaram para ambos os tratamentos. As amostras elutriadas em pH 8,2 (grupo controle) apresentaram pH de 7,18 após a ressuspensão dos sedimentos e, após 24 de decantação, o pH não retornou ao valor inicial de controle. Sendo assim, a exposição dos organismos no controle não acidificado se deu, inicialmente, em pH 7,46. Sem injeção de CO<sub>2</sub>, o pH se elevou gradualmente ao longo da exposição e, no encerramento do ensaio, após 42 horas de exposição, o pH atingiu o valor máximo de 7,88.

No grupo acidificado, o pH das amostras após a elutriação foi de 7,14 e a exposição dos embriões ocorreu com pH inicial de 7,42. O pH final desejado (7,6) foi atingido apenas nas últimas 10 horas de exposição dos organismos (ou seja, mais de 60 horas após o processo de elutriação). Desta forma, como os efeitos sobre o desenvolvimento embriolarval de *Echinometra lucunter* se iniciam nas primeiras horas de desenvolvimento, quando os cenários de pH eram muito parecidos, isso pode ter influenciado a ausência de efeito do pH, seja isolado, seja sobre a toxicidade do TBT para o desenvolvimento embriolarval de *E. lucunter*.

A ressuspensão dos sedimentos faz com que a matéria orgânica (incluindo ácidos húmicos, normalmente abundantes em sedimentos de manguezais) e os nutrientes, naturalmente presentes em maior quantidade no ambiente sedimentar, sejam disponibilizados na coluna d'água, causando redução do pH e do oxigênio dissolvido inicial (Tabela 3). Além disso, a oxidação de sulfetos metálicos (especialmente FeS) presentes no sedimento também pressiona o pH em direção à acidificação.

Em relação ao fator “nível de contaminação” todas as concentrações testadas apresentaram diferença significativa em relação ao controle sedimento+acetona, inclusive a concentração de 5µg/kg, cujo desenvolvimento médio das larvas foi maior que o controle ( $p < 0.05$ ), ou seja, nesta concentração, a diferença significativa não representa efeito tóxico. Enquanto as médias de larvas *pluteus* bem desenvolvidas nos controles não contaminados estiveram entre 56 e 69%, nas amostras contendo TBT em concentrações de 500µg/kg mais de 90% dos embriões não se desenvolveram. Já nas amostras da maior concentração (5000µg/Kg) os organismos não foram sequer encontrados no momento da leitura do ensaio, possivelmente devido à rápida mortalidade no momento da exposição e posterior degradação longo das 42 horas do teste. A concentração de 50µg/kg apresentou efeito tóxico.

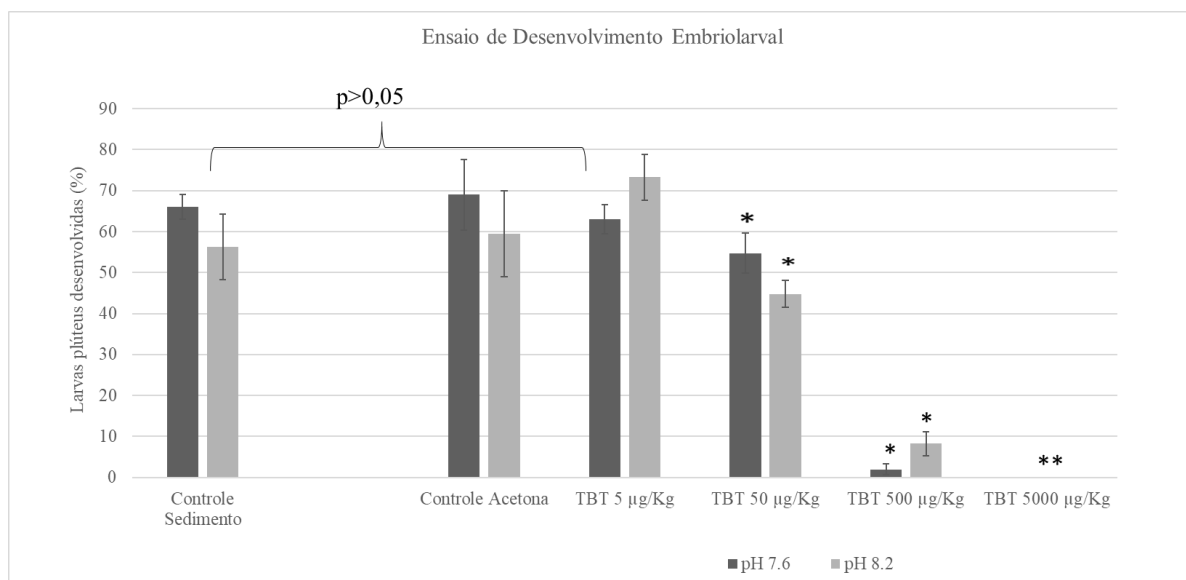


Figura 4. Ensaio preliminar de desenvolvimento embriolar com amostras de elutriado. Os asteriscos (\*) representam amostras com diferença significativa do controle acetona ( $p < 0,05$ ).

Com base nos resultados obtidos no ensaio preliminar, a concentração de 5000µg/kg foi reduzida para 1000µg/kg. Assim como no primeiro ensaio, os parâmetros físico-químicos oxigênio dissolvido, salinidade, temperatura e amônia não ionizada, mensurados no início e ao final do teste permaneceram dentro dos limites estabelecidos para o organismo modelo (ABNT, 2006), como apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados dos ensaios de toxicidade com elutriado e interface sedimento-água e os parâmetros físico-químicos analisados (OD= Oxigênio Dissolvido, Sal= Salinidade, Temp= Temperatura, NH3= Amônia Não Ionizada e salinidade). Amostras contendo \* foram consideradas outliers.

		Elutriado													
		Desenvolvimento Embriolarval (%)						O.D. (mg/L)		Sal		Temp (°C)		NH3 (mg/L)	
	Amostra	R1	R2	R3	R4	Média	DP	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
pH 7,6	Controle Sedimento	99	100	100	99	<b>99,50</b>	0,577	3,63	3,94	36	36	24,3	25,6	0,030	<LQ
	Controle Acetona	98	100	99	96	<b>98,25</b>	1,708	3,99	4,87	35	36	24,3	25,7	0,035	0,025
	TBT 5 µg/Kg	100	99	100	100	<b>99,75</b>	0,5	4,19	4,4	35	36	24,3	25,3	0,039	0,037
	TBT 50 µg/Kg	99	100	94	98	<b>97,75</b>	2,63	4,24	6,09	35	36	24,3	25,3	0,040	0,032
	TBT 500 µg/Kg	97	100	98	98	<b>98,25</b>	1,258	5,15	4,48	36	36	24,3	25,5	0,029	0,028
	TBT 1000 µg/Kg	0	0	0	0	<b>0,00</b>	0	5,63	4,8	36	36	24,5	25,5	0,032	0,029
pH 7,1	Controle Sedimento	100	100	98	98	<b>99,00</b>	1,155	2,58	3,15	34	36	24,3	25,6	0,007	0,007
	Controle Acetona	99	98	99	99	<b>98,75</b>	0,5	6,2	7,51	35	36	24	24,9	0,010	0,008
	TBT 5 µg/Kg	96	97	100	93	<b>96,50</b>	2,887	3,66	5,54	35	36	24,5	25,3	0,014	0,009
	TBT 50 µg/Kg	99	100	98	99	<b>99,00</b>	0,816	4,91	5,77	35	36	24,4	25,4	0,014	0,009
	TBT 500 µg/Kg	100	96	98	98	<b>98,00</b>	1,633	4,13	4,54	35	36	24,1	25,4	0,013	0,010
	TBT 1000 µg/Kg	0	0	0	0	<b>0,00</b>	0	4,99	5,15	35	36	24,5	25,4	0,013	0,008
		Interface Sedimento-Água													
		Desenvolvimento Embriolarval (%)						O.D. (mg/L)		Sal		Temp (°C)		NH3 (mg/L)	
	Amostra	R1	R2	R3	R4	Média	DP	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
pH 7,6	Controle Sedimento	3*	98	94	99	<b>97</b>	2,16	3,47	3,46	35	36	24,6	25,9	0,046	0,040
	Controle Acetona	81	99	94	88	<b>90,5</b>	6,727	3,54	3,65	35	36	24,8	26	0,042	0,027
	TBT 5 µg/Kg	96	87	98	92	<b>93,25</b>	4,206	3,27	5,55	35	37	24,8	26	0,068	0,043
	TBT 50 µg/Kg	95	91	90	83	<b>89,75</b>	4,323	3,04	4,04	36	36	24,8	26	0,054	0,051
	TBT 500 µg/Kg	95	91	95	92	<b>93,25</b>	1,785	3,53	4,23	36	36	24,8	26	0,040	0,048
	TBT 1000 µg/Kg	0	0	0	0	<b>0</b>	0	3,78	3,9	35	36	24,8	26,1	0,050	0,051
pH 7,1	Controle Sedimento	98	89	91	90	<b>92</b>	3,536	3,42	3,21	36	36	24,4	25,7	0,010	0,008
	Controle Acetona	3*	99	98	92	<b>96,33</b>	3,091	3,88	3,63	35	36	24,6	25,6	0,017	0,016
	TBT 5 µg/Kg	96	96	96	79	<b>91,75</b>	7,361	3,47	3,98	35	37	24,6	25,6	0,013	0,016
	TBT 50 µg/Kg	95	95	97	98	<b>96,25</b>	1,299	3,65	3,61	35	36	24,6	25,7	0,014	0,012
	TBT 500 µg/Kg	48*	98	99	100	<b>99</b>	0,816	3,79	3,75	35	36	24,5	25,8	0,011	0,013
	TBT 1000 µg/Kg	0	0	0	0	<b>0</b>	0	3,62	3,54	35	36	24,7	25,8	0,014	0,015

O fator “ressuspensão”, assim como a interação deste com o fator “pH” apresentaram influência significativa (Tabela 7) sobre a toxicidade do TBT para os embriões de *Echinometra lucunter* de acordo com a análise estatística PERMANOVA ( $p < 0,05$ ), no entanto, como pode ser observado na Figura 5, este resultado é reflexo do alto desenvolvimento embriolarval observado nas amostras de elutriado, cujas médias variaram entre 96 e 100%. Nas amostras de interface sedimento-água as médias variaram entre 89,75 e 99%. De acordo com o teste *Pair wise*, a diferença foi significativa entre as amostras de elutriado e ISA no pH 7,6, sendo que na interface, o desenvolvimento foi menor. Ainda que o resultado represente uma diferença marginal de toxicidade entre Elutriado e ISA no pH 7,6 (menos ácido), e que isso pode não representar em um fenômeno biológico relevante, uma vez que o protocolo no qual o ensaio se baseia (ABNT, 2006) indica ausência de toxicidade em amostras com desenvolvimento superior

à 80%, cumpre notar que essa diferença significativa acontece apenas no tratamento de pH menos ácido testado, e que ela é acompanhada por uma ligeira perda de amônia não-ionizada no processo de elutriação, coisa que não acontece no tratamento de pH 7,1. Sabe-se que a volatilidade da amônia não ionizada é maior em pHs mais básicos, e, portanto, a ligeira - porém sensível - perda de amônia na elutriação pode ter contribuído com a diferença de desenvolvimento embrio-larval entre os tratamentos elutriação e ISA no pH 7,6.

*Tabela 7. Resultados da análise de PERMANOVA avaliando efeito da contaminação de TBT, pH do meio, ressuspensão do sedimento e interação destes fatores sobre o desenvolvimento embriolarval de Echinometra lucunter. Valores destacados em negrito indicam  $p < 0,05$*

Elutriado e ISA ( <i>Echinometra lucunter</i> )					
	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
Perturbação	1	253,17	253,17	22	<b>0,001</b>
pH	1	43	43	3,72E+04	0,062
Contaminação	4	1,17E+09	29264	2555,6	<b>0,001</b>
Perturbação vs. pH	1	65,054	65,054	5,68E+03	<b>0,027</b>
Contaminação vs. Perturbação	4	98,414	24,604	2,1486	0,083
Contaminação vs. pH	4	107,57	26,893	2,3485	0,06
Pert. vs. pH vs. Cont.	4	27,195	6,7988	0,59372	0,672
Residual	58	664,17	11,451		
Permanova - Pair-Wise Test					
Elutriado vs ISA	pH 7,1		pH 7,6		
	t	p (Perm)	t	p (Perm)	
	1,6969	0,078	4,8795	<b>0,001</b>	
pH 7,1 vs pH 7,6	Elutriado		ISA		
	t	p (Perm)	t	p (Perm)	
	0,7207	0,489	2,2059	<b>0,041</b>	

Como apresentado na Tabela 7, no segundo ensaio de elutriação e de interface sedimento-água não foi observada influência isolada do fator pH sobre o desenvolvimento embriolarval de *Echinometra lucunter* ( $p > 0,05$ ). A exemplo do que aconteceu anteriormente no ensaio preliminar, o pH da água para elutriação do tratamento não-acidificado, inicialmente em 8,2, foi reduzido para 7,6. Os sistemas foram mantidos em repouso para que o sedimento ressuspensionado decantasse, e, como o pH se manteve em 7,6, este valor passou a ser o pH controle do ensaio. Desta forma, a fim de manter a diferença de 0,5 prevista para os próximos 100 anos (IPCC, 2011), as amostras do tratamento acidificado tiveram o pH reduzido para 7,1. Neste caso, as amostras foram elutriadas já em pH 7,6, no entanto, diferentemente do ensaio preliminar, após a elutriação o pH se manteve estável.

A ausência de efeito da acidificação sobre a biodisponibilidade e toxicidade do TBT pode



estar relacionada com a faixa de concentração testada. Diferentemente do ensaio com sedimento integral, onde os organismos foram expostos diretamente ao sedimento contaminado, os ensaios de elutriação e interface sedimento-água têm como objetivo avaliar a transferência do contaminante do sedimento para a coluna d'água adjacente. Como apresentado anteriormente, na faixa de pH e salinidade (35), na qual os organismos foram expostos, o TBT tende a um  $K_d$  maior (Langston e Pope, 1995; Burton *et al*, 2004; Dowson *et al*, 1993b), ou seja, nas concentrações de 5, 50 e 500  $\mu\text{g/Kg}$  o TBT pode ter sido quase que totalmente adsorvido/readsorvido ao sedimento, e a fração solúvel não foi capaz de causar efeito aos organismos expostos. Já na concentração de 1000  $\mu\text{g/Kg}$  o nível de contaminação pode ter exercido forte pressão para a redução do  $K_d$  (Langston e Pope, 1995), aumentando a disponibilidade de TBT na fração aquosa e consequente fluxo para a coluna d'água adjacente. Neste nível de contaminação, em ambos os pHs e estados de perturbação não foram observadas larvas *pluteus* e os indivíduos tiveram seu desenvolvimento cessado ainda na fase de ovo, não apresentando nem os primeiros estágios de divisão celular.

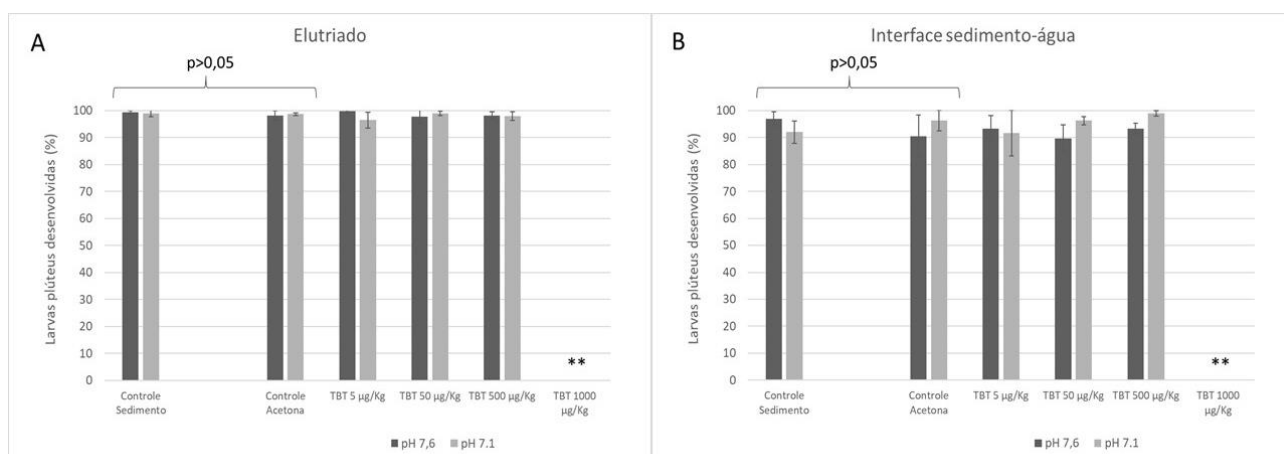


Figura 5. Ensaio de desenvolvimento embriolarval com amostras de A: Elutriado e B: Interface sedimento água. Os asteriscos (\*) representam amostras com diferença significativa do controle acetona ( $p < 0,05$ ).

### 3.4. Aspectos legais

Apesar do certo grau de solubilidade em determinadas condições, onde as frações solúveis de TBT tendem a se ligar à matéria orgânica apolar, entrar em processo de bioacumulação (Fent

e Looser, 1995) ou fotodegradação (Unger *et al.*, 1988), os estudos mais recentes apontam que os níveis ambientais de TBT na coluna d'água caíram drasticamente ao longo dos anos. No entanto, a forte afinidade do TBT pelo material particulado aliado à sua persistência no ambiente sedimentar é a principal causa de preocupação acerca dessa substância. O elevado grau de contaminação dos sedimentos de regiões portuárias e marinas, mesmo após anos de seu banimento (Shim *et al.*, 2000; Barakat *et al.*, 2001; Bhosle *et al.*, 2004; Viglino *et al.*, 2006; Berto *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2009; Abidli *et al.*, 2011; Castro & Fillamnn, 2012; Castro *et al.*, 2012; Artifon *et al.*, 2016) indica que o TBT deve ser um problema ambiental ainda pelas próximas décadas.

A elevada persistência do TBT no ambiente sedimentar foi reportada por diversos autores (de Mora *et al.* 1989; Astruc *et al.*, 1989; Waldock *et al.*, 1990; Dowson *et al.*, 1996; Furdek *et al.*, 2016), que observaram que sua meia-vida nos sedimentos pode ser calculada em unidades de anos ou décadas. Estudos realizados com testemunhos, indicaram que em sedimentos datados da década de 70 e 80, quando as discussões acerca do uso dessa substância estavam iniciando, o TBT ainda predomina sobre seus produtos de degradação (DBT e MBT) (Dowson, 1993a, Kim *et al.*, 2011).

Em locais com altas taxas de sedimentação, o sedimento contaminado se torna mais profundo, onde as condições de anoxia, ausência de luz e baixas temperaturas favorecem a persistência do TBT no ambiente. No mais, regiões portuárias com altas taxa de sedimentação são frequentemente submetidas à dragagem do canal de navegação e dos berços de atracação, disponibilizando o TBT presente nos sedimentos mais profundos (Dowson, 1993b), ou os produtos de sua degradação, DBT e MBT, cuja persistência no ambiente é ainda maior que a do TBT (Dowson *et al.*, 1996). DBT e MBT ainda são mais solúveis em água e apresentam elevada toxicidade (Wang *et al.*, 2004).

Com base nos resultados dos ensaios de toxicidade com sedimento integral, elutriado e interface sedimento água, as concentrações de efeito ( $CE_{50}$  com método de correção de Abbot) do TBT sobre o desenvolvimento embriolarval *Echinometra lucunter* e fecundidade de *Nitokra sp* foram calculadas e estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados das concentrações de efeito ( $CE_{50}$ ) obtidas nos ensaios com *Nitokra sp* e Embriões de *Echinometra lucunter*.

	Sedimento integral ( <i>Nitokra sp</i> )		Elutriado (Embriões de <i>Echinometra lucunter</i> )		Interface sedimento-água	
	pH 7,6	pH 7,1	pH 7,6	pH 7,1	pH 7,6	pH 7,1
$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/Kg}$ )	372,5	4,172	700,2	700	622,8	586,7
IC- 95% ( $\mu\text{g/Kg}$ )	192,9 - 719,5	1,894 - 9,188	316,8 - 1.548	316,7 - 1.547	288,9 - 1.343	246,8 - 1.394

No cenário acidificado a  $CE_{50-96h}$  de TBT sobre a fecundidade de *Nitokra sp.* foi substancialmente menor. Enquanto em pH 7,6 a  $CE_{50-96h}$  de TBT sobre a reprodução de *Nitokra sp.* foi de 372,5 $\mu\text{g/Kg}$  (IC 95%: 192,9 – 719,5  $\mu\text{g/Kg}$ ), no ambiente acidificado este valor caiu para 4,2 $\mu\text{g/Kg}$  (IC 95%: 1,89 - 9,19 $\mu\text{g/Kg}$ ). Nos ensaios de desenvolvimento embriolarval de *Echinometra lucunter* as  $CE_{50-42h}$  não diferiram significativamente entre os tratamentos e foram maiores que as observadas para *Nitokra sp.* No entanto, a exposição dos organismos ao contaminante no elutriado e na interface sedimento água se dá de forma indireta, uma vez que a substância analisada é adicionada ao sedimento e estas matrizes indicam a capacidade de transferência do contaminante entre compartimentos ambientais.

Dessa forma, é importante ressaltar a necessidade de refinamento das concentrações testadas no elutriado e na ISA, uma vez que é possível que haja efeito do pH em concentrações intermediárias entre 500 e 1000 $\mu\text{g/kg}$ . No presente estudo, nos cenários de exposição impostos, a concentração de 500 $\mu\text{g/Kg}$  pode ter sido completamente adsorvida ao sedimento na ISA e readsorvida após a elutriação, enquanto na concentração de 1000 $\mu\text{g/Kg}$  o efeito tóxico do contaminante não permitiu a expressão de efeitos do pH.

Estes resultados corroboram os trabalhos de Dowson (1993a) e Langston e Pope (1995), que observaram que a sorção do TBT no sedimento é reversível e que processos de ressuspensão

podem disponibilizá-lo para os organismos da coluna d'água quando em altas concentrações. Os valores de  $CE_{50}$  obtidos alertam acerca dos níveis considerados seguros para dragagem de sedimentos contaminados pela maioria dos países que possuem algum tipo de regulamentação para concentrações de TBT no ambiente.

Dentre os países que possuem legislação para monitoramento dos níveis de TBT nos sedimentos, os únicos que consideram que concentrações abaixo de 100  $\mu\text{g/Kg}$  representam risco à biota aquática são Bélgica, Alemanha (OSPAR, 2008) e Austrália (ANZECC & ARMCANZ, 2000). No Brasil, a regulamentação que limita as concentrações de TBT em sedimento submetidos à dragagem é a Resolução CONAMA 454 de 2012 (Brasil, 2012). De acordo com a legislação brasileira, para sedimentos dragados, a concentração limiar abaixo da qual há menor probabilidade de efeitos adversos à biota (nível 1) é 100 $\mu\text{g/kg}$  para TBT, ou seja, abaixo desta o TBT provavelmente não causa efeito deletério à biota aquática. Já a concentração de 1000 $\mu\text{g/kg}$  é determinada como o limiar acima do qual há maior probabilidade de efeitos adversos à biota (nível 2). No presente estudo, as  $CE_{50}$  estimadas apresentam os valores abaixo do nível 2 da CONAMA 454/2011, o que permite afirmar que sedimentos dragados que apresentem concentrações de TBT adequados segundo a resolução, poderão apresentar toxicidade para organismos aquáticos. Se nos atentarmos ao cenário de acidificação previsto para os próximos 100 anos, a  $CE_{50}$  de TBT para *Nitokra* sp está muito abaixo do que é considerado como nível 1, ou seja, abaixo da concentração que, teoricamente, não causa efeito deletério à biota.

Apesar dos esforços internacionais acerca do banimento do TBT em produtos anti-incrustantes (IMO, 2001), nos países em desenvolvimento o uso desta substância ainda é frequente (Castro *et al.*, 2011; Zeidan & Boehs, 2015; Paz-Vilarraga *et al.*, 2015; Artifon *et al.*, 2016; Martínez *et al.*, 2017). Apesar dos inúmeros estudos sobre o comportamento do TBT no ambiente aquático, pouco se sabe sobre a mobilidade deste entre os compartimentos ambientais,

principalmente em estuários tropicais. Com exceção de Brasil e Austrália todos os outros países com regulamentação sobre os limites ambientais do TBT são de clima temperado (Europa, EUA e Canadá) e dizem respeito apenas ao ambiente sedimentar. No entanto, além dos impactos evidentes sobre a biota bentônica é preciso considerar que a redistribuição ocorre durante a ressuspensão e causa efeitos sobre organismos da coluna d'água em concentrações abaixo do que é preconizado como seguro pela legislação vigente, o que destaca a necessidade de revisão dos valores guia atuais para TBT, a fim de proteger a biota aquática e a saúde dos ecossistemas costeiros.

#### 4. Conclusão

Com base nos resultados expostos é possível concluir que no ambiente sedimentar a redução do pH causa efeito sobre a fecundidade de *Nitokra* sp e que o aumento da acidez intensifica o efeito tóxico do TBT. Esta relação entre toxicidade e pH não foi observada nos ensaios de elutriação e interface sedimento-água, no entanto não é possível descartá-la, uma vez que não foram analisadas concentrações intermediárias entre 500 e 1000µg/kg, nas quais este efeito poderia se manifestar. Nas exposições ao elutriado e à ISA, os efeitos se deram apenas na maior concentração de TBT e já de forma muito drástica, onde nenhum indivíduo apresentou desenvolvimento embriolarval normal. Nestes ensaios, a toxicidade pode estar associada à redução do  $K_d$  do TBT devido ao alto nível de contaminação. Os efeitos da perturbação também não foram observados, mas assim como para o pH, este pode se manifestar em concentrações entre 500 e 1000µg/Kg, o que sugere a realização de novos ensaios a fim de elucidar estas questões.

Independentemente das mudanças de pH previstas para os próximos 100 anos, nas condições atuais o TBT se mostra extremamente tóxico para diversas espécies em concentrações abaixo do preconizado pela legislação como limiar de efeito provável (Nível 2). Nas concentrações consideradas seguras para dragagem ( $\leq 1000\mu\text{g/Kg}$ ) foram observados

efeitos severos aos organismos expostos ao sedimento contaminado, elutriado e à ISA. Considerando as concentrações de efeito ( $CE_{50}$ ) calculadas para as 3 matrizes analisadas com dois organismos distintos, somadas aos resultados obtidos por outros autores, os resultados sugerem indícios de que os valores de TBT constantes na legislação vigente que regula a qualidade do sedimento dragado (CONAMA 454/2011) são inadequados

Recomenda-se ainda, com o fim de se estabelecer concentrações seguras de TBT voltadas à proteção dos ecossistemas marinhos e estuarinos, que os estudos de revisão dos valores-guia de qualidade de matrizes ambientais considerem os cenários acidificados previstos para o próximo século. Uma vez que este e outros estudos identificaram que a biodisponibilidade do TBT está diretamente relacionada ao pH e que a persistência dele no ambiente, além da continuidade irregular de seu uso como anti-incrustante, deve representar um passivo ambiental para as próximas décadas, é importante ponderar o comportamento deste contaminante em cenários futuros na determinação de concentrações ambientalmente seguras.

## Referências Bibliográficas

- Abidli S, Lahbib Y, Trigui El Menif N. 2011. Imposex and butyltin concentrations in *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae) from the northern Tunisian coast. *Environ Monit Assess.* 177(1-4):375-84.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2006. Toxicidade crônica de curta duração – método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata; Echinoidea). Norma Técnica NBR no. 15350, São Paulo, 17p.
- Allen, H. 1971. Effects of petroleum fractions on the early development of a sea urchin. *Mar Pol Bul*, 2:138-140.
- Anderson BS, Hunt JW, Hester MM, Phillips BM. 1996. Assessment of sediment toxicity at the sediment–water interface. In: Ostrander, G.K. (ed). *Techni aqua toxic*. CRC Press, Flórida, pp. 609–624.
- Anderson BS, Hunt JW; Phillips BM, Fairey R, Puckett HM, Stephenson M, Taberski K, Newman J, Tjeerdema RS. 2001. Influence of sample manipulation on contaminant flux and toxicity at the sediment-water interface. *Mar Environ Res*; 51(3): 191-211.
- ANZECC & ARMCANZ (Australian and New Zealand Environment and Conservation Council and Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand). 2000. *Australian and New Zealand Guidelines for Fresh and Marine Water Quality*. Disponível em: <http://www.environment.gov.au/water/publications/quality/index.html#nwqmsguidelines>. Acessado em 21/09/2017.
- Arnold CG, Weidenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP 1997. Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ Sci Technol* 31:2596-2602.
- Artifon V, Castro ÍB, Fillmann G. 2016. Spatiotemporal appraisal of TBT contamination and imposex along a tropical bay (Todos os Santos Bay, Brazil). *Environ Sci Pollut Res Int.* 23(16):16047-55
- ASTM (American Society for Testing and Materials). 2008. E1367-03 (redline) - Standard test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine invertebrates. *Annual Book of ASTM Standards: Waters and Environmental Technology*.
- Astruc M, Lavigne R, Pinel R, Desauziers V, Quevauviller Ph., Donard. (1989) Speciation of Trace Tin in Sediments of Arcachon Bay, in: J.W. Patterson and R. Passino (Eds.), *Metal Speciation, Separation and Recovery*, Lewis Publishers, Rome, Vol. 2, pp. 263-281.
- Barakat AO, Kim M, Qian Y, Wade TL. 2001. Butyltin compounds in sediments from the commercial harbor of Alexandria City, Egypt. *Environ Toxicol Chem.*; 20(12):2744-8.

- Bartlett AJ, Borgmann U, Dixon DG, Batchelor SP, Maguire JR. 2004. Accumulation of tributyltin in *Hyalella azteca* as an indicator of chronic toxicity: Survival, growth, and reproduction. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23 (12): 2878-2888.
- Batley, G.E., Brockbank, C.I. and Scammel, MS. 1992. The impact of banning of tributyltinbased anti-fouling paints on the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*, *Science of the Total Environment* 122: 301-314.
- Bellas J, Beiras R, Marino-Balsa JC, Fernández N. 2004. Toxicity of organic compounds to marine invertebrate embryos and larvae: a comparison between the sea urchin embryogenesis bioassay and alternative test species. *Ecotoxicology*; 14: 337–353.
- Berto D, Giani M, Boscolo R, Covelli S, Giovanardi O, Massironi M, Grassia L. 2007. Organotins (TBT and DBT) in water, sediments, and gastropods of the southern Venice lagoon (Italy). *Mar Pollut Bull.*; 55(10-12):425-35.
- Bhosle NB, Garg A, Jadhav S, Harjee R, Sawant SS, Venkat K, Anil AC. 2004. Butyltins in water, biofilm, animals and sediments of the west coast of India. *Chemosphere*; 57(8):897-907.
- Borges CLL, Fernandez MAS, Castro IB, Fillmann G. 2013. Organotin pollution from pleasure craft at paraty, a tourist area of southeastern brazil: amelioration or interference? *Braz J Ocean*, 61(3):177-186.
- BRASIL. Resolução CONAMA nº 454, de 01 de novembro de 2012. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional.
- Burton Jr., G.A. 1992. *Sediment toxicity assessment*. Lewis Publishers, Inc., Chelsea. 457p.
- Burton ED, Phillips IR, Hawker DW. 2004. Sorption and Desorption Behavior of Tributyltin with Natural Sediments. *Environmental Science & Technology*, 38(24), 6694–6700.
- Caldeira, K e Wickett, M.E. 2005. Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *J Geo Res*. 110, C09S04, 1-12.
- Callow ME, Callow J.A. 2002. Marine biofouling: a sticky problem. *Biologist.*; 49:1–5.
- Campbell A, Mangan S, Ellis R, Lewis C. 2014. Ocean Acidification Increases Copper Toxicity to the Early Life History Stages of the Polychaete *Arenicola marina* in Artificial Seawater. *Environmental Science and Technology*. 48: 9745-9753.
- Canadian Council of Ministers of the Environment. 1999. Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: Organotins — Tributyltin, triphenyltin, and tricyclohexyltin. In: *Canadian environmental quality guidelines, 1999*, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg.



- Canty MN, Hagger JA, Moore RTB, Cooper L, Galloway TS. 2007. Sublethal impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Mar Pollut Bull*, 54: 396–402
- Carpenter, R. C. 1986. Partitioning herbivory and its effects on coral reef algal communities. *Ecological Monographs* 56:345-363.
- Castro, IB, Westphal, E, Fillmann, G, 2011. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. *Química Nova*; 34: 1021–1031.
- Castro IB, Perina FC, Fillmann G. 2012. Organotin contamination in South American coastal areas. *Environ Monit Assess.*; 184:3. pp.1781-99.
- Castro IB, Perina FC, Fillmann G. 2012. High tributyltin and imposex levels in the commercial muricid *Thais chocolata* from two Peruvian harbor areas. *Environ Toxicol Chem.*; 31(5):955-60.
- Cesar, A. 2003. *Análisis ecotoxicológico integrado de la contaminación marina en los sedimentos de la costa de Murcia: el caso de Portmán, sudeste – España*. Tese de Doutorado. Universidad de Murcia, Departamento de Ecología e Hydrología, 252p.
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 2011. Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos / Companhia Ambiental do Estado de São Paulo; Organizadores: Carlos Jesus Brandão ... [et al.]. -- São Paulo: CETESB; Brasília: ANA.
- Champ, M.A. and Seligman. 1996. An introduction to organotin compounds and their use in anti-fouling coatings. In: *Organotin: Environmental fate and effects*. Eds Champ, M.A. and Seligman, P.F. Chapman and Hall Publishers London. ISBN 0412 58240 6.
- Chapman, PM. 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. *Mar Pol Bul*, 44(1): 7-15.
- Cherr, GN; Shenker, JM; Lundmark, C.; Turner, KO. 1987. Toxic effects of selected bleached kraft mill effluent constituents on the sea urchin sperm cell. *Environ Toxic Chem*; 6(7): 561–569
- Choi M, Moon HB, Yu J, Eom JY, Choi HG. 2010. Temporal Trend of Butyltins in Seawater, Sediments, and Mussels from Busan Harbor of Korea Between 2002 and 2007: Tracking the Effectiveness of Tributyltin Regulation. *Arch Environ Contam Toxicol*. 58(2):394-402.
- Choueri, R. B., Cesar, A., Torres, R. J., Abessa, D. M. S., Morais, R. D., Pereira, C. D. S., ... DelValls, T. A. 2009. Integrated sediment quality assessment in Paranaguá Estuarine System, Southern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72:7. 1824–1831.
- Clare, AS, 1996. Marine natural product antifoulants: status and potential. *Biofouling*; 9:211-229.
- Clark, EA, Sterritt RM, Lester JN. 1988. The fate of tributyltin in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol*. 22:600-604.

- Corbin, HB. 1976. The solubilities of bis(tributyltin) oxide (TBTO), tributyltin fluoride (TBTF), triphenyltin hydroxide (TPTH), triphenyltin fluoride (TPTF), and tricyclohexyltin hydroxide (TCTH) in water as functions of temperature and pH value. *Research and Development Technical Memorandum* R-1145-M. M&T Chemicals Inc., Rahway, NJ.
- Corbisier TN. 1991. Benthic macrofauna of sandy intertidal zone at Santos estuarine system, São Paulo, Brazil. *Bol Inst Ocean*, 39(1):1-13.
- Costa BVM, Yogui GT, Souza-Santos LP. 2014. Acute toxicity of tributyltin on marine copepod *Tisbe biminiensis*. *Braz J Ocean*. 62(1):65-69
- De Orte, MR; Lombardi, AT; Sarmiento, AM; Basallote, M.D; Rodriguez-Romero, A; Riba, I; Del Valls, A. 2014. Metal mobility and toxicity to microalgae associated with acidification of sediments: CO<sub>2</sub> and acid comparison. *Mar Environ Res*; 96:136-144.
- De Mora SJ, King NG, Miller MC. 1989. Tributyltin and Total Tin in Marine Sediments: Profiles and the Apparent Rate of TBT Degradation. *Environ. Technol.* 10, 901-908.
- DEFRA - Department for Environment, Food and Rural Affairs. 2010. Research and Support for Developing a UK Strategy for Managing Contaminated Marine Sediments. London, UK.
- DeWitt TH, Redmond MS, Sewall JE, Swartz RC. 1992. Development of a chronic sediment toxicity test for marine benthic amphipods. *Contribution USEPA/ERL Narragansett*, No. N- 240.
- Dickson AG, Millero FJ. 1987. A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep-Sea Research* 34: 1733–1743.
- Dinnel, PA & Stober, QJ. 1985. Methodology and analysis of sea urchin embryo bioassays. In: *Circular*, 85 (3), School of Fisheries, University of Washington.
- Dinnel, P.A.; Link, J.M.; Stober, Q.J.; Letourneau, M.W.; Roberts, W.E. 1989. Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassays to metals and pesticides. *Environ Cont Toxic*; 18 (5): 748-755.
- Dowson, PH, Bubb JM, and Lester LN. 1993a. Depositional profiles and relationships between organotin compounds in freshwater and estuarine sediment cores. *Environ. Monit. Assess.* 28: 145-160.
- Dowson PH, Bubb JM, and Lester LN. 1993b. A study of the partitioning and sorptive behaviour of butyltins in the aquatic environment. *Appl. Organomet. Chem.* 7: 623–633.
- Dowson PH, Bubb JM, Lester JN. 1996. Persistence and Degradation Pathways of Tributyltin in Freshwater and Estuarine Sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 42(5), 551–562.
- Dwivedi J & Trombetta L. 2006. Acute Toxicity and Bioaccumulation of Tributyltin In Tissues Of *Urolophus jamaicensis* (Yellow Stingray). *Journal of Toxicology and Environmental Health*. Part A. 69: 1311-23.

- Erickson, RJ, McKim, JM, Lien, GJ, Hoffman, AD, Batterman, SL, 2006. Uptake and elimination of ionizable organic chemicals at fish gills. II. Observed and predicted effects of pH, alkalinity, and chemical properties. *Environ Toxicol Chem*; 25: 1522–1532.
- Fent K. 1996. Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 26: 1–117.
- Fitzer S, Caldwell G, Close A, Clare A, Upstill-Goddard R, Bentley M. 2012. Ocean acidification induces multi-generational decline in copepod naupliar production with possible conflict for reproductive resource allocation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 418-419. 30-36.
- Furdek M, Mikac N, Bueno M, Tessier E, Cavaleiro J, Monperrus, M. 2016. Organotin persistence in contaminated marine sediments and porewaters: In situ degradation study using species-specific stable isotopic tracers. *Journal of Hazardous Materials*, 307, 263–273.
- Garcia R, Chung K, Key P, Burnett L, Coen L, Delorenzo M. 2014. Interactive Effects of Mosquito Control Insecticide Toxicity, Hypoxia, and Increased Carbon Dioxide on Larval and Juvenile Eastern Oysters and Hard Clams. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 66.
- Geffard O, Budzinski H, His E. 2002. The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bioaccumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin. *Ecotoxicology*; 11: 403-416
- Gu B, Schmitt J., Chen Z.; Llang L.; McCarthy JF. 1994. Adsorption and desorption of natural organic matter on iron oxide: mechanisms and models. *Environ. Sci Tech*, 2:38-48
- Gross MG. 1971. Carbon determination. In: Carver, R.E. (ed) *Procedures in Sedimentary Petrology*. New York, Wiley-Interscience, 672p.
- Hagopian-Schlekat T, Chander GT, Shaw TJ. 2001. Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Mar. Environ. Res.* 51: 247-264.
- Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ Sci Tech*, 7: 714-719. Correction, 12: 417 (1978)
- Hoch M. 2001. Organotin compounds in the environment –an overview. *Applied Geochemistry*; 16: 719 - 743.
- Horiguchi T. 2006. Masculinization of female gastropod mollusks induced by organotin compounds, focusing on mechanism of actions of tributyltin and triphenyltin for development of imposex. *Environ Sci*; 13(2): 77–87
- Huggett, RJ, Unger, MA, Seligman, PF, Diego, S, Valkirs, A, Diego, S, 1992. The marine biocide Tributyltin: Assessing and managing the environmental risks. *Environmental Science and Technology*; 26:232–237.

- IMO – International Maritime Organization. 1998. *Phase out of organotin anti-fouling paints agreed*. London, UK.
- IMO – International Maritime Organization. 2001. *Adoption of the Final Act of International Convention on the Control of Harmful Anti-Fouling Systems on Ships*.
- IPCC- Intergovernmental Panel Climate Change. 2011. Summary for Policymakers. In: *IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation* [O. Edenhofer, R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, K. Seyboth, P. Matschoss, S. Kadner, T. Zwickel, P. Eickemeier, G. Hansen, S. Schlömer, C. von Stechow (eds)], Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- IPCS - International Programme on Chemical Safety. 1990. Environmental Health Criteria, 116, Tributyltin compounds, World Health Organization, Geneva.
- Kobayashi N. 1971. Fertilized sea urchin eggs as an indicatory material for marine pollution bioassay, preliminary experiments. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory*, 18: 379–408.
- Kobayashi N & Okamura H. 2002. Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. *Mar Pol Bul*; 44:748–751.
- Kurihara H, Shimode S, Shirayama Y. Sub-Lethal Effects of Elevated Concentration of CO<sub>2</sub> on Planktonic Copepods and Sea Urchins. *Journal of Oceanography*. 60 (4): 743-750.
- Kurihara H & Shirayama Y. 2004. Seawater carbonate chemistry and processes during experiments with seaurchins *Hemicentrotus pulcherrimus* and *Echinometra mathaei*, 2004. PANGAEA, <https://doi.org/10.1594/PANGAEA.721138>, Supplement to: Kurihara, H; Shirayama, Y (2004): Effects of increased atmospheric CO<sub>2</sub> on sea urchin early development. *Marine Ecology Progress Series*, 274: 161-196.
- Kwok KWH & Leung KMY. 2005. Toxicity of antifouling biocides to the intertidal harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* (Crustacea, Copepoda): effects of temperature and salinity. *Marine Pollution Bulletin*. 51: 830-837.
- Lam NH, Jeong HH, Kang SD, Kim DJ, Ju MJ, Horiguchi T, Cho HS. 2017. Organotins and new antifouling biocides in water and sediments from three Korean Special Management Sea Areas following ten years of tributyltin regulation: Contamination profiles and risk assessment. *Mar Poll Bull*. 121(1-2): 302 -312.
- Langston WJ, Bryan GW, Burt GR, Gibbs EE. 1990. Assessing the impact of tin and TBT in estuaries and coastal regions. *Functional Ecol*. 4: 433-443.
- Langston WJ & Burt GR. 1991. Bioavailability and effects of sediment-bound TBT in deposit-feeding clams, *Scrobicularia plana*. *Mar. Environ. Res*. 32: 61-77.
- Langston WJ & Pope ND. 1995. Determinants of TBT adsorption and desorption in estuarine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 31(1-3): 32–43.

- Lee C, Hong S, Kwon BO, Lee JH, Ryu J, Park YG, Kang SG, Khim JS. 2016. Lethal and sub-lethal effects of elevated CO<sub>2</sub> concentrations on marine benthic invertebrates and fish. *Environ Sci Pollut Res*; 23:14945–14956
- Leenheer JA & Reddy MM. 2008. Co-precipitation of dissolved organic matter by calcium carbonate in Pyramid Lake, Nevada. *Annals Environ Sci*, 2:11-25.
- Lofrano G, Libralato G, Alfieri A, Carotenuto M. 2016. Metals and tributyltin sediment contamination along the Southeastern Tyrrhenian Sea coast. *Chemosphere*, 144: 399–407
- Lotufo, GR; Abessa, DMS. 2002. Testes de toxicidade com sedimentos total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. In: Nascimento, I.A. Sousa, E.C.P.M., Nipper, M.G (Ed.), *Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*. São Paulo: Artes Gráficas e Indústria Ltda, 151-162
- Luczak, C, Janquin, MA, Kupka, A, 1997. Simple standard procedures for the routine determination of organic matter in marine sediment. *Hydrobiologia*; 345: 87-94
- Martínez ML, Pio MN, Nudelman NS, Guerrero NRV. 2017. Tributyltin bioaccumulation and toxic effects in freshwater gastropods *Pomacea canaliculata* after a chronic exposure: field and laboratory studies. *Ecotoxicology*; 26:691–701
- Meador, JP. 2000. Predicting the Fate and Effects of Tributyltin in Marine Systems. *Rev Environ Contam Toxicol*, 166: 1-48.
- Meador, JP and Rice CA. 2001. Impaired growth in the polychaete *Armandia brevis* exposed to tributyltin in sediment. *Mar Environ Res*; 51(2):113-129
- Mehrbach C, Culberson CH, Hawley JE, Pytkowicz RN. 1973. Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. *Limnology and Oceanography* 18: 897–907.
- Moreira LB. 2009. *Avaliação da toxicidade dos sedimentos e da macrofauna bentônica em áreas portuárias: porto do Mucuripe e terminal portuario do Pecem (CE) e porto de Santos (SP)*. Dissertação de Mestrado em Ciencias Marinhas Tropicais - Instituto de Ciencias do Mar, Universidade Federal do Ceará.
- Moreira LM, Castro IB, Hortellani MA, Taniguchi S, Fillmann G, Sasaki ST, Petti MAV, Sarkis JES, Bicego MC, Maranhão LA, Davanzo MB, Nonato EF, Cesar A, Costa-Lotufo LV, Abessa DMS. 2013. Integrated quality assessment of sediments from harbour areas in Santos-São Vicente Estuarine System, Southern Brazil. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 130: 179-189.
- Murai, R, Sugimoto A, Tanabe S, Takeuchi I. 2008. Biomagnification profiles of tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT) in Japanese coastal food webs elucidated by stable nitrogen isotope ratios. *Chemosphere*; 73:1749–1756.

- Nikinmaa M. 2013. Climate change and ocean acidification—Interactions with aquatic toxicology. *Aquatic Toxic*, 126: 365-372
- Nobre, M. & Santos, FR. 2005. O mercado de transporte marítimo: especialização, evolução e os reflexos na logística internacional. In: *XII Simpósio de Engenharia de Produção*, SIMPEP 2005, Bauru, SP.
- Nowell LH, Capel PD, Dileanis, PD. 1999. Pesticides in stream sediment and aquatic biota distribution, trends, and governing factors Florida. Lewis Publishers.
- Okazaki K, Inoue S. 1976. Crystal property of the larval sea urchin spicule. *Dev Growth Differ* 18:413–434.
- Oliveira IB, Richardson CA, Sousa AC, Takahashi S, Tanabe S, Barroso CM. 2009. Spatial and temporal evolution of imposex in dogwhelk *Nucella lapillus* (L.) populations from North Wales, UK. *J Environ Monit.*;11(8):1462-8
- OSPAR Commission. 2008. Overview of Contracting Parties' National Action Levels for Dredged Material. *Biodiversity Series*.
- Pascal P, Fleegeer J, Galvez F, Carman K. 2010. The toxicological interaction between ocean acidity and metals in coastal meiobenthic copepods. *Marine Pollution Bulletin*. 60: 2201-8.
- Paz-Villarraga CA, Castro IB, Miloslavich P, Fillmann G. 2015. Venezuelan Caribbean Sea under the threat of TBT. *Chemosphere* 119: 704–710
- Perina, FC. 2009. *Avaliação da toxicidade de biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Brasil.
- Petracco M, Camargo RM, Berenguel TA, Arruda NCLP, Matto LA del, Amado LL, Corbisier TN, Castro ÍB, Turra A. 2015. Evaluation of the use of *Olivella minuta* (Gastropoda, Olividae) and *Hastula cinerea* (Gastropoda, Terebridae) as TBT sentinels for sandy coastal habitats. *Environ Monit Assess*; 187 (7).
- Pierrot DE, Lewis E, Wallace DWR. 2006. MS Exel Program Developed for CO<sub>2</sub> System Calculations, ORNL/CDIAC-105 a Carbon Dioxide Information Analysis Centre, Oak Ridge National Laboratory, US Department of Energy.
- Prósperi VA, Araújo MMS. 2002. Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus* Lamarck 1816 e *Echinometra lucunter*, Linnaeus 1758 (Echinodermata: Echinoidea). In: Nascimento, I. A; Sousa, E. C. P. M.; Nipper, M. (Ed.), *Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil*. São Paulo: Artes Gráficas e Indústria Ltda, p. 99-110.
- Pusceddu FH, Choueri RB, Pereira CDS, Cortez FS, Santos DRA, Moreno BB, Santos AR, Rogero JR, Cesar A. 2018. Environmental risk assessment of triclosan and ibuprofen in marine sediments using individual and sub-individual endpoints. *Environ Pollu*. 232:274-283.
- Rendal C, Kusk KO, Trapp S. 2011. Optimal choice of pH for toxicity and bioaccumulation studies of ionizing organic chemicals. *Environ Toxicol Chem*; 30(11):2395-406.



- Ruiz JM, Bryan GW, Gibbs PE. 1994. Bioassaying the toxicity of tributyltin-(TBT)-polluted sediment to spat of the bivalve *Scrobicularia plana*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 113: 119-30.
- Seligman PF, Maguire RJ, Lee RF, Hinga KR, Valkirs AO, Stang PM. 1996. Persistence and fate of tributyltin in aquatic ecosystems. In: *Environmental fate and effects*. Eds Champ, M.A. and Seligman, P.F. Chapman and Hall Publishers London. ISBN 0412 582406.
- Shim WJ, Kahng SH, Hong SH, Kim NS, Kim SK, Shim JH. 2000. Imposex in the rock shell, *Thais clavigera*, as evidence of organotin contamination in the marine environment of Korea. *Mar Environ Res.*; 49(5):435-51
- Smith BS, 1971. Sexuality in the American mud snail, *Nassarius obsoletus* Say. *Proceedings of the Malacological Society of London* 39: 377–381.
- Sordo L, Santos R, Reis J, Shulika A, Silva J. 2016. A direct CO<sub>2</sub> control system for ocean acidification experiments: testing effects on the coralline red algae *Phymatolithon lusitanicum*. *PeerJ* 4:e2503
- Sousa A, Laranjeiro F, Takahashi S, Tanabe S, Barroso CM. 2009. Imposex and organotin prevalence in a European post-legislative scenario: temporal trends from 2003 to 2008. *Chemosphere.*;77(4):566-73.
- Sousa EC, Zaroni LP, Filho TF, Marconato L, Kirschbaum A, Gasparro MR. 2012. Acute sensitivity to Nitokra sp benthic copepod to potassium dichromate and ammonia chloride. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 7 (1): 75-81.
- Stringer TJ, Glover CN, Keesing V, Northcott GL, Gaw S, Tremblay LA. 2014. Development of acute and chronic sediment bioassays with the harpacticoid copepod *Quinquelaophonte* sp. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 99:82–91.
- Tao Y, Pan L, Zhang H, Tian S, 2013. Assessment of the toxicity of organochlorine pesticide endosulfan in clams *Ruditapes philippinarum*. *Ecotox Environ Safety*, 93:22–30.
- Waldock MJ, Thain JE, Smith D, Milton S. (1990) The Degradation of TBT in Estuarine Sediments, in: 3rd International Organotin Symposium Proceedings, Monaco, 17-20 April, IAEA, pp. 176--177.
- Wang X, Hong H, Zhao D, Hong L. 2008. Environmental behavior of organotin compounds in the coastal environment of Xiamen, China. *Marine Pollution Bulletin*, 57(6-12), 419–424.
- Wentworth CK. 1922. A scale of grade and class terms for clastic sediments. *Journal of Geology*, 30:377-392.
- WHOI (Woods Hole Oceanographic Institution). 1952. *Marine fouling and its prevention*; Naval Institute: Annapolis, MA, USA.
- Williams SL, Carpenter RC. 1988 Nitrogen-limited primary productivity of coral reef algal turfs: potential contribution of ammonium excreted by *Diadema antillarum*. *Mar Ecol Prog Ser*. 47: 145–152

- Viglino L, Pelletier E, Lee LE. 2006. Butyltin species in benthic and pelagic organisms of the Saguenay Fjord (Canada) and Imposex occurrence in common whelk (*Buccinum undatum*). *Arch Environ Contam Toxicol.*; 50(1):45-59
- Yebra DM., Kiil S, Dam-Johansen K. Review. Antifouling technology – past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog. Org. coat.*; 50: 75- 104
- Tavares YAG, Borzone CA, Kawall HG. 2003. Biochemical changes in the gonad in relation to the reproductive cycle of *Echinometra lucunter* and *Arbacia lixula* in southern Brazil. In: International Conference on Fisheries and Aquaculture, 2003, Puerto Varas. Proceedings of the International Conference on Fisheries and aquaculture. Lancaster: Destech Publications. v. 1. p. 147-155.
- USEPA - U. S. Environmental Protection Agency. 1991. Evaluation of Dredged Material Proposed for Ocean Disposal. EPA 503/8-91/001.
- USEPA – U. S. Environmental Protection Agency. 2001. Technical Manual. Methods for collection, storage and manipulation of sediments for chemical and toxicological analyses. Chapter 5: Sediment Manipulations.
- USEPA – U. S. Environmental Protection Agency. 2002. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. *Relatório Técnico, 3rd. Ed, U.S. EPA-821-R-02-014*, 486p.
- USEPA - U. S. Environmental Protection Agency. 2003. A Compendium of Chemical, Physical and Biological Methods for Assessing and Monitoring the Remediation of Contaminated Sediment Sites. *EPA/68-W-99-033*. Duxbury, MA.
- USEPA - U. S. Environmental Protection Agency. 2004. Notice of Availability of Final Aquatic Life Criteria Document for Tributyltin (TBT). *Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria for Tributyltin (TBT)—Final (EPA-822-R-03-031)*
- USEPA- and USCOE 1977. Ecological evaluation of proposed discharge of dredged material into ocean waters; Implementation manual for Section 103 of Public Law 92-532 (marine protection, research, and sanctuarie act of 1972). EPA Science Inventory.
- Zagatto, PA. 2006. Ecotoxicologia. In: Zagatto, PA. & Bertolotti, E. (eds.), *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Rima, São Carlos. pp. 1-13.
- Zar JH. 1996. *Biostatistical analysis*, 3rd. Ed. Nova Jersey, Prentice-Hall, 662p.
- Zeidan, GC & Boehs, G. 2015. Assessment of tributyltin contamination based on imposex in *Stramonita rustica* along southern Bahia coast, northeastern Brazil. *Braz. J. Biol.*, 77(1): 185-190